

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 940**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/00** (2006.01)  
**C12N 9/00** (2006.01)  
**C12N 9/34** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)  
**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2007 E 07869893 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2115151**

54 Título: **Métodos y vectores que generan inmunoglobulinas sialiladas**

30 Prioridad:

**28.12.2006 US 882301 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.07.2014**

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)  
800/850 Ridgeview Drive  
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**NASO, MICHAEL;  
RAJU, T. SHANTHA;  
SCALLON, BERNARD y  
TAM, SUSAN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 474 940 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y vectores que generan inmunoglobulinas sialiladas

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## Campo de la invención

10 [0001] La invención se refiere a métodos de producción de proteínas terapéuticas que interactúan con receptores Fc, por ejemplo, anticuerpos, en los que la composición de las cadenas oligosacáridas están optimizadas para la severidad del anticuerpo para su diana, así como para la afinidad de unión al receptor Fc optimizando la actividad de la función efectora de dichos anticuerpos en comparación con métodos no optimizados de producción de anticuerpos glicosilados.

## 15 Descripción de trabajos relacionados

20 [0002] Los anticuerpos son glicoproteínas de suero solubles que desempeñan un papel importante en la inmunidad innata. Las estructuras de hidratos de carbono de todos los anticuerpos producidos de forma natural en las posiciones conservadas en las regiones constantes de cadena pesada varían según el isotipo. Cada isotipo posee una matriz distinta de estructuras de oligosacáridos N ligados, que afectan variablemente a la unión de proteínas y a la actividad secretora o funcional (Wright, A., y Morrison, SL, Trends Biotech. 15: 26 - 32 (1997)). Haciendo referencia a las Figs. 1 y 2, la estructura de los oligosacáridos N ligados varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir un alto contenido en manosa, así como oligosacáridos biantenarios complejos con o sin bisectriz GlcNAc y residuos de fucosa de núcleo (Wright, A., y Morrison, SL, supra).  
25 Normalmente, el procesamiento heterogéneo se da en las estructuras del núcleo de oligosacáridos unidos a un sitio de glicosilación particular, de tal manera que existen incluso anticuerpos monoclonales con múltiples glicofomas. Del mismo modo, se ha demostrado que las principales diferencias en la glicosilación de anticuerpos se producen entre las líneas celulares productoras de anticuerpos, e incluso se han visto diferencias menores para una línea celular dada crecido en diferentes condiciones de cultivo.

30 [0003] El ácido siálico en los glicanos (grupos estáticos) son conocidos por ser importantes en la prolongación de la semivida en suero de las glicoproteínas que no son anticuerpos (Stockert, RJ (1995) Physiol. Rev. 75, 591 - 609). Hasta ahora, el papel del ácido siálico en los anticuerpos monoclonales (mAbs) no se comprendía bien. La semivida en suero de los anticuerpos monoclonales es particularmente larga y se ha demostrado que la construcción de proteínas de fusión con Fc es una estrategia útil en el desarrollo de proteínas terapéuticas, por ejemplo, la proteína enteracept.  
35

40 [0004] Los anticuerpos y moléculas receptoras de células T poseen regiones responsables de la unión al receptor de superficie celular específico, cuya unión modula la respuesta celular. En el sistema inmune, estas funciones se clasifican como humoral y celular. Los anticuerpos se denominan a menudo moléculas adaptadoras que se unen mecanismos inmunes humorales y celulares: las respuestas humorales se atribuyen principalmente a anticuerpo circulantes, maduros y secretados capaces de unirse con alta afinidad a un antígeno diana. Las respuestas celulares se atribuyen a las consecuencias de la activación celular mediante la unión de los complejos de AB - AG y por las secuelas aguas abajo causadas por la liberación de mediadores celulares como resultado de la unión del complejo  
45 AB - AG a las células efectoras. Estas respuestas celulares incluyen la neutralización de diana, la opsonización y la sensibilización (si el antígeno se muestra en la superficie de una célula), la sensibilización de mastocitos, y la activación del complemento. Para las dianas celulares, es decir, los antígenos de la superficie celular, estas funciones efectoras dan lugar a lo que se conoce comúnmente como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

50 [0005] Entre los isotipos de anticuerpos (por ejemplo, IgE, IgD, IgA, IgM e IgG), las IgG son los más abundantes, y las subclases IgG1 que muestran el grado y la variedad de las funciones efectoras más significativos. Los anticuerpos de tipo IgG1 son los anticuerpos más utilizados comúnmente en la inmunoterapia del cáncer, donde la actividad de ADCC y de CDC a menudo se consideran importantes. Estructuralmente, las IgG de la región bisagra y los dominios CH2 desempeñan un papel importante en las funciones efectoras de anticuerpos. Los oligosacáridos N ligados presentes en la región Fc (formada por la dimerización de la bisagra, y los dominios CH2 y CH3) afectan a las funciones efectoras. Los oligosacáridos con enlaces covalentes son estructuras de tipo biantenario complejos y son muy heterogéneos (véanse las Figs. 1 y 2). En cada dominio CH2 se encuentra un sitio de glicosilación N ligado conservado en Asn297. En el anticuerpo maduro, los dos oligosacáridos biantenarios complejos unidos a  
55 Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensos con la cadena principal del polipéptido. Se ha encontrado que su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en las funciones efectoras, tales como la ADCC (Lifely, MR, et al, Glycobiology 5: 813 - 822 (1995);. Jefferis, R., et al, Immunol Rev. 163: 59 - 76 (1998); Wright, A. y Morrison, SL, supra, Scallon et al. 2006. Mol. Immunol. 44: 1524 - 1534).

65 [0006] Los oligosacáridos heterogéneos que decoran el anticuerpo Fc-porción o las estructuras de derivados de anticuerpos comprendidas producidos por diversas células huésped contienen predominantemente ácido siálico,

fucosa, galactosa y residuos de GlcNAc como azúcares terminales (Raju, TS, et al *Glycobiology* 2000 10 (5): 477 - 86). Se ha demostrado que algunos de estos azúcares terminales, en particular la galactosa expuesta, la fucosa nuclear y los residuos de GlcNAc bisecados, afectan a la estructura de la porción Fc de la molécula y, por lo tanto, altera las funciones efectoras de anticuerpos. Las funciones efectoras tales como la actividad de ADCC y de CDC que se basa en la unión a receptores de la superficie celular conocidos como receptores de Fc, así como la unión a diversos ligandos incluyendo el complemento de proteína C1q puede alterarse por la composición del glicano adjunto (Presta L. 2003. *Curr Opin Struct Biol.* 13 (4): 519 - 25). La mayoría de los glicanos N ligados en la FC no están sialilados en una medida significativa (Idusogie EE, et al. 2000. *J. Immunol.* 15: 164 (8): 4178 - 84). Se conocen métodos de modificación de sialilación: Dalziel et al, 1999. *Glycoconjugate journal* 16: 801 - 807, patentes WO 2005 016 455 y WO99 / 54342.

[0007] Los principales estructuras que se encuentran en la IgG humana y otras IgG producidas de forma recombinante son las estructuras complejas biantenarias con o sin residuos de Gal expuestos (Fig. 1). Hay un número de células huésped de mamífero que se utilizan actualmente para expresar anticuerpos recombinantes con fines de investigación, así como para la producción biofarmacéutica. Las especies de las células huésped de origen, así como las condiciones de cultivo pueden causar la variación de la extensión y la estructura de los glicanos adjuntos a moléculas expresadas de forma recombinante. Dos líneas celulares huésped comúnmente utilizadas para la expresión recombinante de anticuerpos son las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células de mieloma de ratón (SP2 / 0, 653, NS0). Mientras que las células CHO expresan anticuerpos recombinantes que están virtualmente desprovistos de ácido siálico de glicanos, los glicanos están fucosilados al 99%. Se ha demostrado que la presencia de fucosa es un contribuyente importante para el receptor de Fc-gammaIII reducido y, por lo tanto, de ADCC. Las células de mieloma de ratón expresan anticuerpos recombinantes con hasta un 50 % de ácido siálico, pero con, generalmente, menos fucosa. Como se ha indicado anteriormente, estas diferencias pueden tener efectos significativos en la actividad del anticuerpo *in vivo*.

[0008] Por tanto, sería deseable poder reducir la sialilación de glicanos asociados a los anticuerpos terapéuticos de manera que se eliminara la necesidad de un procesamiento posterior a la recogida y, al mismo tiempo, proporcionara una estructura razonablemente homogénea con respecto al contenido en ácido siálico. Las enzimas modificadoras de la sialilación se han discutido previamente, por ejemplo Ngangtung de 2005, de la Universidad de Minnesota.

## RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La invención presenta un método para proporcionar una actividad enzimática de la sialidasa en un cultivo que comprende una célula de mamífero modificada genéticamente para expresar una molécula que contiene F, a través de la cual los glicanos de la molécula que contiene Fc puedan actuar en la actividad enzimática del polipéptido sialidasa, incluyendo la transfección de la célula de mamífero modificada con un vector que codifica el dominio catalítico de la enzima sialidasa A de *Arthrobacter ureafaciens*, en el que el dominio catalítico se secreta en el cultivo junto con la molécula que contiene Fc. La invención también presenta un método para producir una molécula que contiene Fc que incluye el método anterior.

[0010] La invención también presenta un método para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc expresada en una línea celular, incluyendo la reducción de la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc mediante la transfección de la línea celular con un vector que codifica el dominio catalítico de la enzima sialidasa A de *Arthrobacter ureafaciens*, en el que la molécula expresada que contiene Fc comprende una cantidad reducida de residuos de ácido siálico, en el que las propiedades controladas de la molécula que contiene Fc son la severidad de la molécula para multiplicar proteínas diana localizadas; la afinidad por uno o más de los receptores Fc gamma de FcγRI, FcγRIIA, y FcγRIIIA; La actividad de ADCC; la activación de macrófagos o de monocitos; y la semivida en suero.

[0011] La invención también presenta un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima sialidasa A de *Arthrobacter ureafaciens*, en el que el vector es capaz de expresar un polipéptido que tiene actividad enzimática de la sialidasa en un cultivo de células de mamífero que expresan una molécula que contiene Fc, en el que la línea celular de mamífero se selecciona del grupo que consiste en células COS - 1, COS - 7, HEK293, BHK21, CHO, BSC - 1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, HeLa, YB2 / 0 o Y3, células de mieloma o linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[0012]

**Fig. 1** es una representación esquemática de la estructura de oligosacárido más grande encontrada en la IgG humana.

**Fig. 2** representa las principales estructuras de oligosacáridos encontrados en una IgG recombinante producida en células de ovario de hámster chino (CHO) .

- Fig. 3** muestra los resultados de un análisis de HPLC de oligosacáridos Fc. Los oligosacáridos N ligados se liberaron, en primer lugar, del anticuerpo mediante el tratamiento con la enzima F PNGasa. Los oligosacáridos liberados se marcaron con ácido antranílico y los oligosacáridos marcados se purificaron por cromatografía de filtración en gel. Los oligosacáridos marcados purificados se analizaron por HPLC, dando como resultado el cromatograma mostrado.
- Figs. 4A y 4B** son gráficos que muestran la unión de diferentes Ab1: complejos inmunes TNF a FcγRII humano en células K562 mediante dos formatos diferentes. (A) Competición de unión medida mediante la adición de cantidades variables de complejos no marcados de Ab1 y TNF a las células en presencia de una cantidad fija de IgG1 Ab5 humana marcada con <sup>125</sup>I complejado con Ab6, un Ab monoclonal específico de ratón para Ab5. (B) Unión directa medida mediante la adición a las células K562 de cantidades variables de Ab1 complejados con TNF marcados con <sup>125</sup>I.
- Figs. 5A – D** son gráficos de los estudios de la unión de FcγRIIIa con diversas preparaciones de Ab de prueba utilizadas para competir con anti-FcγRIIIa mAb 3G8 radiomarcado a una concentración fija para unirse a la célula NK FcγRIIIa: variantes de glicosilación natural de Ab1 (A); variantes de glicosilación natural de Ab5 (B); fracciones de la columna de lectina de Ab1 (C); y fracciones de la columna de lectina de Ab2 (D).
- Figs 6A – D** son gráficos que muestran los resultados de ensayos de ADCC *in vitro* realizados utilizando Ab1 que difieren en el contenido de ácido siálico, de células diana K2 que sobreexpresan TNF en su superficie celular, y de células efectoras PBMC humanas que expresan FcγRs. (A) variantes de glicosilación naturales de Ab1, (B) variantes de glicosilación naturales de Ab2, (C) Comparación de tres subgrupo de Ab1 que difieren en el contenido de ácido siálico seguido del fraccionamiento basado en afinidad de lectina WGA, y de Ab1 enzimáticamente desglicosilada (Gno), (D) Comparación de una muestra de Ab1 no tratada y de una muestra totalmente sialilada de Ab1 G2S2, o control negativo Ab, emparejado por isotipo Ab. Las muestras se analizaron por triplicado (las barras de error representan la s.d.) y los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes para cada par de variantes. La diferencia en la actividad entre estas muestras de ensayo fue significativa (P < 0,0001 para los gráficos de A, C, y D, p = 0,0015 para el gráfico B) tal como se determina por la prueba F de la suma extra de los cuadrados.
- Figs. 7A y B** son gráficos que muestran la unión competitiva de diversas muestras de anticuerpo IgG frente al receptor humano FcγRI (CD64) en células U-937 (A) Ab1 G2 (totalmente galactosiladas y sin sialilar) y Ab1 G2S2 (HI) (totalmente galactosilados y totalmente sialilada) sólo se diferencian por la ausencia y la presencia de ácido siálico, (B) dos lotes diferentes de Ab3 difieren en la cantidad de especies de oligosacáridos cargadas (especies que contienen ácido siálico), siendo el 2% o el 42% del oligosacárido total.
- Fig. 8** es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo tras la administración y la concentración sérica de la parte Fc de una proteína de fusión (FCP1) que había sido completamente sialilada (G2S2) o sin modificar.
- Fig. 9** es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo tras la administración y la concentración sérica de la parte Fc de una Ab2 G2S2 completamente sialilada, o de Ab2 G2 totalmente asialilada, Ab2 G2, mediante métodos enzimáticos tal y como se describe.
- Fig. 10A – D** son gráficos que muestran el efecto del ácido siálico en las preparaciones de Ab en la afinidad para el ligando diana en la superficie celular mediante la unión competitiva con Ab radiomarcado: (A) variantes naturales de Ab1, (B) variantes naturales de Ab5, (C) variantes de la parte lectina de la columna de Ab1, y (D) variantes de la parte lectina de la columna de Ab2. Las muestras se ensayaron por duplicado o cuadruplicado, y los resultados mostrados son representativos de 3 o 4 experimentos independientes. La diferencia en la unión entre estas muestras de ensayo fue significativa (P < 0,0001 para los gráficos de A, C, y D) como se determina por la prueba F de la suma extra de los cuadrados.
- Fig. 11A – B** son gráficos que muestran el efecto del ácido siálico en las preparaciones de Ab en la afinidad para el ligando diana recubierto en placas de EIA: (A) variantes naturales de Ab1 unidas a TNF, (B) Ab2 unido a un anticuerpo anti - Id.
- Fig. 12A – C** son gráficos que muestran el efecto del ácido siálico en las preparaciones de Ab en la afinidad para el ligando diana presentado como antígeno soluble radiomarcado unido a la superficie a Ab: (A) variantes naturales de Ab1, (B) variantes de la parte lectina de la columna de Ab1, y (C) variantes de la parte lectina de la columna de Ab2. Se realizaron incubaciones paralelas con Ag radiomarcado y un exceso de 100 veces de Ag no marcado para determinar la unión no específica. Las muestras se ensayaron por triplicado.
- Fig. 13** es una representación esquemática de la expresión del plásmido p3629 construido para expresar el dominio catalítico de la salidasa A de *Arthrobacter ureafaciens* vinculada a la secuencia señal de la hGH (hormona del crecimiento humana) con sitios de enzimas de restricción utilizados para la clonación en el vector parental, P2815, indicado.
- Fig. 14** es un gráfico que representa la actividad de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos purificados a partir de líneas celulares que expresan el dominio catalítico de la salidasa secretada; Los clones 3, 5, 12, 13, y 17.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

## Abreviaturas

5 **[0013]**  $\alpha 1$ , 3GT,  $\alpha - 1$ , 3 - galactosiltransferasa;  $\alpha 2$ , 3ST,  $\alpha - 2$ , 3 - sialiltransferasa;  $\beta 1$ , 4GT,  $\beta - 1$ , 4 - galactosiltransferasa; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; ATCC, *American Type Culture Collection*; BATDA, bis (acetoximetil) 2, 2': 6', 2" - terpiridina - y, y" - dicarboxilato; BSA, albúmina de suero bovino; Medio de CD, medio de cultivo químicamente definido; CDC, citotoxicidad dependiente del complemento; CMP - Sia, ácido N - acetilneuramínico monofosfato de citidina; DMEM, medio de Eagle modificado de Dulbecco; E: T, proporción célula efectora por célula diana; FBS, suero fetal bovino; ESI - MS, espectrometría de masas de ionización por electrospray. Células NK, células asesinas naturales; IgG, inmunoglobulina G; IMDM, medio de Dulbecco modificado por Iscove; MALDI - TOF - MS, espectrometría de masas por láser de desorción / ionización asistida por matriz; MHX, ácido micofenólico, hipoxantina, xantina.; NANA, isómero del ácido N - acetilneuramínico de ácido siálico; NGNA, isómero del ácido N - glicolilneuramínico de ácido siálico; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; PBS, solución salina tamponada con fosfato; PNGasa F, péptido Nglycosidase F; RP - HPLC, cromatografía de fase líquida de alta resolución inversa; RT, temperatura ambiente; Sia, ácido siálico; UDP - Gal, galactosa uridina difosfato; UDP - GlcNAc, difosfato de uridina N - acetilglucosamina.

## 20 Definiciones

25 **[0014]** El término "actividad de ADCC" se refiere a la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y se refiere al fenómeno de la destrucción de células diana mediada por anticuerpos mediante células efectoras no sensibilizadas. La identidad de la célula diana varía, pero debe haber inmunoglobulina G de unión superficial con un dominio Fc o la parte del dominio capaz de activar el receptor de Fc. La célula efectora es una célula "asesina" que posee receptores Fc. Puede ser, por ejemplo, un linfocito que carece de marcadores convencionales de células T, o B, un monocito, macrófago, o leucocitos polinucleares, dependiendo de la identidad de la célula diana. La reacción se complementa independiente. La actividad ADCC de un anticuerpo u otra proteína que contiene Fc de la presente invención está "mejorada" si su capacidad para demostrar la muerte celular mediada por ADCC supera la capacidad de un anticuerpo o proteína de secuencia sustancialmente similar y el dominio Fc producido por una célula huésped alternativa. La actividad de ADCC puede determinarse en un ensayo estándar de muerte celular *in vivo* o *in vitro*, tales como los ensayos discutidos en este documento. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención que tiene una mayor actividad de ADCC logra el mismo efecto (prevención o inhibición del crecimiento de células tumorales) a una dosis más baja y / o en un tiempo más corto que un anticuerpo de referencia producido en una célula huésped alternativa. Preferiblemente, la diferencia entre la potencia de un anticuerpo dentro del alcance de la presente invención y un anticuerpo de referencia es, al menos, aproximadamente 1,5 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 2 veces, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente 3 veces, más preferiblemente, al menos aproximadamente 5 veces, tal como se determina, por ejemplo, en la comparación lado a lado en un ensayo estándar seleccionado de ADCC de liberación de cromo.

40 **[0015]** El término "afinidad" utilizado en el presente documento pretende ser una medida de la constante de unión de un ligando monovalente simple a su pareja de unión afín, por ejemplo, la unión de un Fab' para un antígeno o epítopo. La afinidad se puede medir de varias maneras, incluyendo pero midiendo las velocidades on - y off - ( $k_{on}$  y  $k_{off}$  respectivamente) mediante, por ejemplo, resonancia de plasmones (BiaCore) y se expresa como una asociación global ( $K_{ass}$ ) o constante de disociación ( $K_D$ ) donde  $K_{ass}$  es  $k_{on} / k_{off}$  y  $K_D$  es  $k_{off} / k_{on}$ .  $K_D$  también se puede medir empíricamente mediante, por ejemplo, la medición de la concentración a la que la unión del ligando a una pareja de unión está medio saturada. Otro método para medir  $K_D$  es mediante ensayo de competición, en el que un agente aglutinante o ligando se marca o etiqueta y se mantiene a una concentración constante mientras se añade el aglutinante o ligando de prueba a concentraciones variables para competir lejos de la sustancia marcada de su unión similar y determinar la concentración a la que la etiqueta se ve disminuida a la mitad.

55 **[0016]** El término "severidad" utilizado en el presente documento pretende ser una medida de la tendencia de un ligando a permanecer unido a una pareja de unión en lo que el ligando y la pareja de unión pueden ser multivalentes y la tendencia para asociaciones múltiples y los eventos de disociación puedan tener lugar simultáneamente para un ligando específico. Por lo tanto, la severidad puede medirse por el aumento de la afinidad aparente de conformaciones multivalentes de una pareja de unión con una afinidad conocida.

60 **[0017]** El término "proteína que contienen Fc" o "molécula que contiene Fc" tal como se utiliza aquí, se refiere a una proteína monomérica, dimérica o heterodimérica que tiene un dominio de unión a ligando y, al menos, una inmunoglobulina CH2 y un dominio CH3. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar, al menos, una parte de la región dimérica de la proteína / molécula (por ejemplo, anticuerpo).

65 **[0018]** El término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos, fragmentos de digestión, partes especificadas y las variantes de las mismas, incluyendo, de manera no limitante, los miméticos de anticuerpo o que comprende porciones de anticuerpos que imitan la estructura y / o la función de un anticuerpo o fragmento especificado o parte del mismo, y que mantiene las funciones mediadas por Fc, incluyendo de manera no limitante: la unión a receptores

de Fc (por ejemplo FcγRI (CD64) FcγRIIA (CD32A), FcγRIIIA (CD16A) y FcRn) , el complemento de unión (por ejemplo, C1q), ADCC y CDC.

5 [0019] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente es una forma específica de proteína de fusión que contiene Fc en la que el dominio de unión a ligando conserva una homología sustancial con, al menos, un anticuerpo de cadena ligera o pesada de dominio variable de, al menos, una especie de anticuerpo animal.

10 [0020] Las "funciones efectoras" de los anticuerpos o análogos de anticuerpos utilizadas en el presente documento son los procesos mediante los cuales los agentes patógenos o células anormales, por ejemplo, las células tumorales, se destruyen y eliminan del cuerpo. Las respuestas inmune, innata y adaptativa utilizan la mayoría de los mismos mecanismos efectores para eliminar patógenos, incluyendo ADCC, AC (activación del complemento), la unión de C1q y opsonización.

15 [0021] Tal y como se usa en este documento, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de sistema celular que pueda ser modificado para generar proteínas, fragmentos de proteínas, o péptidos de interés, incluyendo anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Las células huésped incluyen, de manera no limitante, células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NSO, células SP2 / 0, o células de hibridoma, células de levadura, y células de insectos, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico o tejido cultivado.

20 [0022] El término "ácido siálico" se refiere a cualquier miembro de una familia de azúcares carboxilados de nueve carbonos. El miembro más común de la familia del ácido siálico es el ácido N - acetil neuramínico (2 - ceto - 5 - acetamido - 3, 5 - didesoxi - D - glicero - D - galactonon - ácido I ulopiranososa - 1 - ónico (a menudo abreviado como Neu5Ac, NeuAc o NANA). Un segundo miembro de la familia es N - glicolil - neuramínico (NGNA, Neu5Gc o NeuGc), en el que el grupo N - acetil de NeuAc está hidroxilado. Esta forma es frecuente en las glicoproteínas procedentes de roedores y microbios. Un tercer miembro de la familia del ácido siálico es el ácido - 3 - desoxi - nonulosónico 2 - ceto (KDN) (Nadano et al (1986) J. Biol. Chem. 261: 11550 - 11557; Kanamori et al, J. Biol. Chem. 265: 21811 - 21819 (1990)). También se incluyen ácidos siálicos sustituidos por 9 tales como 9 - OC - C6 acilo Neu5Ac como 9 - O - lactil - Neu5Ac o 9 - O - acetil - Neu5 Ac, 9 - desoxi - 9 - fluoro - Neu5Ac y 9 azido - 9 - desoxi - Neu5Ac. Para la revisión de la familia del ácido siálico, véanse, por ejemplo, Varki, *Glycobiology* 2: 25 - 40 (1992); *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function*, R. Schauer, Ed. (Springer Verlag, Nueva York (1992)).

### Descripción

35 [0023] Considerando que los presentes inventores han descubierto inesperadamente que el nivel de sialilación de los oligosacáridos Fc altera la afinidad de los anticuerpos terapéuticos producidos de forma recombinante para los receptores Fcγ, dando como resultado la modulación de diversos aspectos de las acciones biológicas de dichos anticuerpos. Más específicamente, se descubrió que los Abs altamente sialilados han reducido de manera significativa la afinidad por los receptores de baja afinidad, FcγRIIA (CD32A) y FcγRIIIa (CD16A), y tienen una actividad significativamente reducida en ensayos ADCC *in vitro* en los que se cree FcγRIIIA que es el receptor relevante. Se descubrió además que Abs altamente sialilados han aumentado la afinidad por el receptor Fcγ de alta afinidad, FcγRI (CD64), y que las proteínas que contienen Fc completamente sialiladas han reducido la semidia en suero en comparación con las proteínas que contienen Fc asialiladas o parcialmente sialiladas. Se descubrió además que la eliminación (o la ausencia o la reducción de los niveles) de ácido siálico en los oligosacáridos Fc aumenta la severidad de los anticuerpos terapéuticos producidos de forma recombinante en su molécula diana. Estos descubrimientos y la información de apoyo se han descrito en las solicitudes en trámite U.S 60/ 695,769, 60/ 809,106, 60/ 841,153.

50 [0024] Aunque sin desear estar ligado a ninguna teoría, la eliminación del grupo estático cargado desde el oligosacárido puede interpretarse como que permite una mayor flexibilidad en la estructura general de los anticuerpos, que la flexibilidad imparte una esfera ampliada de interacción potencial para la unión de los dos dominios en relación de uno a otro. La capacidad de un Ab para unirse bivalentemente a dos epítopos de antígeno dependerá también de la accesibilidad epítopo, la orientación, la densidad, y la movilidad. Cada señalar que el efecto de la sialilación de unión al antígeno también puede ser relevante para el Abs que reconocen antígenos virales o bacterianos superficiales, e incluso antígenos solubles que son homopolímeros, puesto que la flexibilidad de Ab puede determinar a qué moléculas Ab individuales se unen bivalentemente dentro de un complejo inmune soluble, donde no sólo podrían unirse algunos Abs a más de un antígeno, sino que algunos de los antígenos pueden unirse mediante más de un Ab.

60 [0025] La presente invención comprende un método para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc mediante la alteración de la sialilación de los oligosacáridos Fc y las moléculas que contienen Fc alteradas. El ácido siálico tiene una carga neta negativa a pH fisiológico y, por lo tanto, podría esperarse que la presencia de ácido siálico en el hidrato de carbono unido a Fc altere la estructura tridimensional y, por tanto, la conformación del dominio CH2 y por lo tanto afecta a la unión a Fc diversos ligandos o receptores. La molécula que contiene Fc alterada afecta a la afinidad de uno o más de los receptores de FcγRI, FcγRIIA, y FcγRIIIa, la actividad de ADCC, la activación de macrófagos o de monocitos, y la semivida en suero.

65

**Enriquecimiento de formas sialiladas de proteínas que contienen Fc**

**[0026]** Un enfoque para preparar subgrupos de una proteína que contiene Fc particular que difieren en el contenido de ácido siálico es tomar una preparación de proteína que contiene Fc con oligosacáridos Fc heterogéneos, incluyendo moléculas tanto sialiladas como asialiladas, y pasarla a través de una columna que contiene una lectina inmovilizada con afinidad diferencial para los oligosacáridos sialilados y asialilados. El flujo no vinculante (T, a través) o la fracción no unida la columna se pueden separar mediante la fracción unida (B, unido), este último recogió mientras pasa tampón de elución a través de la columna. También puede ser posible recoger por separado una fracción débilmente unida o la fracción de la columna de retraso (R, retrasado), por ejemplo, mediante la recopilación de proteína que contiene Fc que se eluye durante el lavado continuado de la columna con el tampón de muestra original. Dependiendo de la lectina utilizada, la fracción no vinculante puede tener un contenido de ácido siálico más alto o más bajo que la fracción que se une.

**[0027]** Los ejemplos de lectinas que pueden enriquecer las proteínas que contienen Fc sialilados o asialilados son la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que une específicamente oligosacáridos con ácido siálico terminal, y la aglutinina de lectina de germen de trigo (WGA), que une específicamente oligosacáridos ya sea con ácido siálico terminal o N - terminal acetilglucosamina (GlcNAc). Otro ejemplo es la lectina ricina I (RCA), que une oligosacáridos con galactosa terminal. En el último ejemplo, la fracción de flujo a través de la no unión puede enriquecerse para las moléculas que contienen Fc sialiladas.

**Modificación enzimática de proteínas que contienen Fc**

**[0028]** Un enfoque alternativo para la preparación de subgrupos de una proteína que contiene Fc que difieren en el contenido de ácido siálico es tratar una parte de una preparación de proteína que contiene Fc con la enzima sialidasa, eliminando de este modo los ácidos siálicos. El material asialilado resultante puede compararse con el material original, parcialmente sialilado por las diferencias en la actividad biológica. Cuanto mayor sea el contenido de ácido siálico en el lote original de proteína que contiene Fc, mayor es la probabilidad de detectar cualquier diferencia en la actividad biológica. Por ejemplo, si sólo el 10 % de los oligosacáridos Fc en la preparación de proteína original contenía ácido siálico, puede ser difícil de detectar diferencias en la actividad biológica después del tratamiento con sialidasa, puesto que el 0 – 1 % de los oligosacáridos contienen ácido siálico. La comparación de la actividad biológica de una proteína que contiene Fc antes y después del tratamiento con sialidasa será más difícil si el tratamiento de sialidasa da como resultado una distribución diferente de los oligosacáridos fucosilados y afucosilados, ya que los niveles de fucosa tienen un profundo efecto en ciertas actividades biológicas, tales como la afinidad por humana FcγRIIIa y la actividad ADCC. Por ejemplo, si una reducción del contenido de ácido siálico del 30 % de los oligosacáridos al 0% da como resultado un aumento en la proporción de oligosacáridos afucosilados del 5 % al 15 %, entonces no será posible atribuir diferencias en la actividad de ADCC únicamente a la disminución en el contenido de ácido siálico. Tal efecto del tratamiento de sialidasa en la proporción relativa de oligosacáridos fucosilados y afucosilados es posible (y se ha observado) debido a la diferencia en la sialilación de oligosacáridos fucosilados y afucosilados antes del tratamiento con sialidasa para eliminar residuos de ácido siálico.

**[0029]** La sialilación de oligosacáridos presentes en la región Fc también se puede lograr utilizando métodos de glicosilación *in vitro*. Utilizando estos métodos, es posible alcanzar glicofomas sialiladas al máximo de muestras de anticuerpo. En base del presente descubrimiento, las glicofomas sialiladas al máximo de anticuerpos u otros constructos que contienen Fc habrán reducido la semivida en suero en comparación con los anticuerpos asialilados o menos sialilados. Por lo tanto, el método de la invención presenta un medio opcional para controlar tanto la homogeneidad de las glicofomas que comprenden anticuerpos como otras construcciones de proteínas recombinantes que contienen una región Fc de inmunoglobulina y los aspectos funcionales *in vivo* de dichos anticuerpos o constructos.

**[0030]** Las glicosiltransferasas naturalmente funcionan para sintetizar oligosacáridos. Estas producen productos específicos con una excelente geometría estereoquímica y regioquímica. La transferencia de residuos de glicosilo se traduce en el alargamiento o la síntesis de un oligo- o polisacárido. Se han descrito numerosos tipos de glicosiltransferasa, incluyendo sialiltransferasas, fucosiltransferasas, galactosiltransferasas, N - acetilgalactosaminiltransferasas, N - acetilglucosaminiltransferasas y similares. Las glicosiltransferasas que son útiles incluyen, por ejemplo, α - sialiltransferasas, α - glucosiltransferasas, α - galactosiltransferasas, α - fucosiltransferasas, α - manosiltransferasas, α - xilosiltransferasas, α - N - acetilhexosaminiltransferasas, β - sialiltransferasas, β - glucosiltransferasas, β - galactosiltransferasas, β - fucosiltransferasas, β - manosiltransferasas, β - xilosiltransferasas, y β - N - acetilhexosaminiltransferasas, tales como las de *Neisseria meningitidis*, o de otras fuentes bacterianas, y los de rata, ratón, conejo, vaca, cerdo, fuentes humanas y de insectos y virus. Preferiblemente, la glicosiltransferasa es una enzima glicosiltransferasa variante de truncamiento en la que el dominio de unión a la membrana ha sido suprimido.

**[0031]** Las galactosiltransferasas ejemplares incluyen α (1,3) galactosiltransferasa (E.C. Nº. 2.4.1.151, véase, por ejemplo, Dabkowski et al., Transplant Proc. 25: 2921 (1993) y Yamamoto et al. Nature 345: 229 -233 (1990)) y α (1,4) - Galactosiltransferasa (E.C. Nº 2.4.1.38). Se pueden utilizar otras glicosiltransferasas, como sialiltransferasa. Una α (2,3) sialiltransferasa, a menudo referida como la sialiltransferasa, se puede utilizar en la producción de sialil

lactosa o estructuras de orden superior. Esta enzima transfiere ácido siálico (NeuAc) de ácido siálico CMP a un residuo de Gal con la formación de un enlace  $\alpha$  entre los dos sacáridos. La unión (enlace) entre los sacáridos es entre la posición 2 - de NeuAc y la posición 3 - de Gal. Una  $\alpha$  (2,3) sialiltransferasa ejemplar conocida como  $\alpha$  (2,3) sialiltransferasa (EC 2.4.99.6) transfiere ácido siálico a la Gal terminal no reductora de un Gal $\beta$  1  $\rightarrow$  disacárido o glicósido 3Glc. Véase, Van den Eijnden et al., J. Biol. Chem., 256:3159 (1981), Weinstein y col., J. Biol. Chem., 257: 13845 (1982) y Wen et al., J. Biol. Chem., 267: 21011 (1992). Otra  $\alpha$  - 2, 3 sialiltransferasa (EC 2.4.99.4) ejemplar transfiere ácido siálico a Gal terminal no reductor del disacárido o el glucósido. Véase Rearick et al., J. Biol. Chem., 254: 4444 (1979) y Gillespie y col., J. Biol. Chem., 267: 21004 (1992). Otras enzimas ejemplares adicionales incluyen Gal -  $\beta$  - 1, 4 - GlcNAc  $\alpha$  - 2, 6 sialiltransferasa (Véase Kurosawa et al. Eur. J. Biochem. 219: 375 - 381 (1994)).

**[0032]** Otras glucosiltransferasas particularmente útiles en la preparación de los oligosacáridos son las manosiltransferasas, incluyendo  $\alpha$  (1, 2) manosiltransferasa,  $\alpha$  (1, 3) manosiltransferasa,  $\beta$  (1, 4) manosiltransferasa, Dol - P - Man sintasa, OCH1 y pMT1.

**[0033]** Sin embargo, otras glucosiltransferasas incluyen N - acetilgalactosaminiltransferasas incluyendo  $\alpha$  (1, 3) N - acetilgalactosaminiltransferasa,  $\beta$  (1, 4) N - acetilgalactosaminiltransferasas (Nagata et al J. Biol. Chem. 267: 12082 - 12089 (1992) ) y Smith et al. J. Biol. Chem. 269: 15162 (1994)) y el polipéptido N - acetilgalactosaminiltransferasa (Homa et al. J. Biol. Chem. 268: 12609 (1993)). N - acetilglucosaminiltransferasas adecuadas incluyen GnTI (2.4.1.101, Hull et al., BBRC 176: 608 (1991)), GnTII, y GnTIII (Ihara et al. J. Biochem. 113: 692 (1993)), GnTV (Shoreiban et al., J. Biol. Chem. 268: 15381 (1993)).

**[0034]** Para aquellas realizaciones en las que el método tiene que ser practicado a escala comercial, puede ser ventajoso inmovilizar la glicosiltransferasa sobre un soporte. Esta inmovilización facilita la eliminación de la enzima del producto y la posterior reutilización de la enzima. La inmovilización de glicosiltransferasas se puede lograr, por ejemplo, mediante la eliminación en la transferasa del dominio de unión a la membrana, y la fijación en su lugar de un dominio de unión a celulosa. Los expertos en la técnica entenderán que también se pueden utilizar otros métodos de inmovilización descritos en la literatura disponible.

**[0035]** Debido a que los sustratos aceptores pueden ser esencialmente cualquier monosacárido u oligosacárido con un residuo de sacárido terminal para el que la glicosiltransferasa particular muestra especificidad, el sustrato puede estar sustituido en la posición de su extremo no reductor. Por lo tanto, el aceptor de glicósido puede ser un monosacárido, un oligosacárido, un sacárido marcado fluorescente, o un derivado de sacárido, tal como un antibiótico aminoglucósido, un gangliósido, o una glicoproteína incluyendo anticuerpos y otras proteínas que contienen Fc. En un grupo de realizaciones preferidas, el aceptor glucósido es un oligosacárido, preferiblemente, Gal $\beta$  (1 - 3) GlcNAc, Gal $\beta$  (1 - 4) GlcNAc, Gal $\beta$  (1 - 3) GalNAc, Gal $\beta$  (1 - 4) GalNAc, Man  $\alpha$  (1, 3)Man, Man  $\alpha$  (1, 6)Man o GalNAc $\beta$  (1 - 4) - manosa. En una forma de realización particular preferida, el oligosacárido aceptor está unido al dominio CH2 de una proteína que contiene Fc.

**[0036]** El uso de sustrato de azúcar activado, es decir, fosfato de nucleósido de azúcar, puede evitarse, ya sea usando una reacción de regeneración simultáneamente con la reacción de la glicosiltransferasa (también conocido como sistema de reciclaje). Por ejemplo, como se enseña en, por ejemplo, la Patente U.S. 6.030.815, un sistema de reciclado de ácido siálico sintetasa CMP utiliza ácido siálico CMP para reponer el ácido siálico CMP (CMP - NeuAc), ya que reacciona con un aceptor de sialiltransferasa en presencia de una  $\alpha$  (2, 3) sialiltransferasa para formar el sialilsacárido. El sistema de regeneración del ácido siálico CMP descrito en la presente invención comprende el monofosfato de citidina (CMP), un trifosfato de nucleósido (por ejemplo, adenosina trifosfato (ATP), un donante fosfato (por ejemplo, fosfoenolpiruvato o fosfato de acetilo), una quinasa (por ejemplo, piruvato quinasa o quinasa de etilo) capaz de transferir el fosfato desde el donador de fosfato de nucleósidos difosfatos y un monofosfato de nucleósido quinasa (por ejemplo, mioquinasa) capaz de transferir el fosfato terminal desde un nucleósido trifosfato a CMP. La  $\alpha$  (2, 3) sialiltransferasa y la ácido siálico CMP sintetasa también se pueden ver como parte del sistema de regeneración de ácido siálico CMP ya que la eliminación del ácido siálico activado sirve para mantener la velocidad de avance de la síntesis. La síntesis y el uso de compuestos de ácido siálico en un procedimiento de sialilación utilizando un fagémido que comprende un gen para una enzima sintetasa de ácido siálico CMP modificado se describen en la solicitud internacional WO 92/16640, publicada el 1 de octubre de 1992.

**[0037]** Un método alternativo de preparación de oligosacáridos es a través del uso de una glicosiltransferasa y derivados glicosilo activados como azúcares donantes obviando la necesidad de nucleótidos de azúcar como azúcares donantes tal como se enseña en la Patente U.S. 5952203. Los derivados de glicosilo activados actúan como suplentes de los sustratos de origen natural, que son nucleótidos de azúcar caros, normalmente nucleótidos difosfoazúcares o monofosfoazúcares en los que el fosfato de nucleótido está ligado al  $\alpha$  en la posición 1 del azúcar.

**[0038]** Los derivados de glicósido activados que son útiles incluyen un grupo saliente activado como, por ejemplo, flúor, cloro, bromo, éster tosilato, mesilato de éster, éster triflato y similares. Las realizaciones preferidas de los derivados de glicósido activados incluyen fluoruros de glicosilo y mesilatos de glicosilo, siendo particularmente preferidos los fluoruros de glicosilo. Entre los fluoruros de glicosilo, son preferibles el fluoruro de  $\alpha$  - galactosilo, fluoruro de  $\alpha$  - manosilo, fluoruro de  $\alpha$  - glucosilo, fluoruro de  $\alpha$  - fucosiltransferasa,  $\alpha$  - xilosilofluoruro, fluoruro de  $\alpha$  -



sialil, fluoruro de alfa - N - acetilglucosaminil, fluoruro de  $\alpha$  - N - acetilgalactosaminil, fluoruro de  $\beta$  - galactosilo, fluoruro de  $\beta$  - manosilo, fluoruro de  $\beta$  - glucosilo, fluoruro de  $\beta$  - fucosilo, fluoruro de  $\beta$  - xilosilo, fluoruro de beta - sialil, fluoruro de  $\beta$  - N - acetilglucosaminil y fluoruro de  $\beta$  - N - acetilgalactosaminil.

5 **[0039]** Los fluoruros de glicosilo pueden prepararse a partir del azúcar por primera acetilación el azúcar y luego tratándolo con HF / piridina. Los fluoruros de glicosilo acetilados pueden desprotegerse mediante una reacción con leve (catalítica) base en metanol (por ejemplo, NaOMe / MeOH). Además, muchos fluoruros de glicosilo están disponibles comercialmente. Otros derivados de glicosilo activados se pueden preparar usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los mesilatos de glicosilo se pueden preparar mediante el tratamiento de la forma hemiacetal totalmente bencilada del azúcar con cloruro de mesilo, seguido de hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilo.

15 **[0040]** Un componente adicional de la reacción es una cantidad catalítica de un fosfato de nucleósido o análogo del mismo. Los monofosfatos de nucleósidos que son adecuados para su uso incluyen, por ejemplo, monofosfato de adenosina (AMP), citidina monofosfato (CMP), uridina monofosfato (UMP), el monofosfato de guanosina (GMP), inosina monofosfato (IMP) y monofosfato de timidina (TMP). Trifosfatos de nucleósido adecuados para uso incluyen trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de citidina (CTP), la uridina trifosfato (UTP), la guanosina trifosfato (GTP), la inosina trifosfato (ITP) y la timidina trifosfato (TTP). Un nucleósido trifosfato preferido es el UTP. Preferiblemente, el fosfato de nucleósido es un nucleósido difosfato, por ejemplo, difosfato de adenosina (ADP), difosfato de citidina (CDP), uridina difosfato (UDP), guanosina difosfato (GDP), difosfato de inosina (IDP) y difosfato timidina (TDP). Un Nucl-preferido difosfato eoside es UDP. Como se señaló anteriormente, la divulgación también se puede practicar con un análogo de los fosfatos de nucleósidos. Los análogos adecuados incluyen, por ejemplo, sulfatos y sulfonatos de nucleósidos. Sin embargo, otros análogos incluyen fosfatos sencillos, por ejemplo, pirofosfato.

25 **[0041]** Un procedimiento para modificar proteínas recombinantes producidas en, por ejemplo, células murinas en las que predomina la forma hidroxilada del ácido siálico (NGNA), es tratar la proteína con sialidasa, para eliminar el ácido siálico de tipo NGNA, seguido de galactosilación enzimática usando el reactivo UDP - Gal y beta1, 4 Galtransferasa para producir glicofomas G2 altamente homogéneas. La preparación puede entonces, opcionalmente, tratarse con el reactivo CMP - NANA y alfa - 2, 3 sialiltransferasa para dar glicofomas G2S2 altamente homogéneas.

35 **[0042]** Cuando se desea la supresión o eliminación de grupos de ácido siálico de los glicanos adjuntos a la región Fc de anticuerpos o moléculas que contienen Fc, se puede utilizar una sialidasa. Se conocen en la disciplina numerosas sialidasas de diversa especificidad. Se ha identificado una célula sialidasa de CHO soluble (Ferrari et al, 1994, *Glycobiology* 4: 367 - 373) y, si se filtra en el medio de cultivo puede ser responsable de la eliminación extracelular del siálico en los glicanos de las proteínas recombinantes. Por lo tanto, es posible que puedan tener lugar adición y eliminaciones de grupos de ácido siálico durante la producción de proteínas recombinantes que pueden explicar las estructuras de glicano variables y heterogéneas en proteínas producidas a partir de líneas celulares CHO.

40 **[0043]** Las sialidasas (neuraminidasas) se han aislado y clonado a partir de una variedad de especies de bacterias en el hombre con diferentes especificidades para los sustratos, por ejemplo, glicoproteínas, glicolípidos, y gangliósidos y los vínculos. Las enzimas con amplia especificidad para el tipo de grupo estático, por ejemplo, ácidos neuramínicos hidroxilado (NGNA) o no hidroxilados y enlaces que pueden ser ácidos siálicos  $\alpha$ 2, 3 -,  $\alpha$ 2, 6 -, o  $\alpha$ 2, 8 - y ramificados unidos a un residuo interno; incluyen los de *Clostridium perfringens* y sialidasas de *Arthrobacter ureafaciens* (sialidasa A, N - acetilneuraminato glicohidrolasa; CE 3.2.1.18). Las enzimas purificadas están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Prozyme, Inc, San Leandro, CA. La secuencia nucleótida de un gen de sialidasa ureafaciens ha sido clonado (Nº de acceso NCBI AY934539) por Lundbeck et al. 2005. *Biotechnolo. Appl. Biochem* 41: 225 - 231.

50 **[0044]** Utilizando los métodos bien conocidos en la técnica, las células huésped que segregan enzimas capaces de actuar en oligosacáridos extracelulares pueden ser construidas como se enseña en, por ejemplo US7, 026,152 para los cultivos capaces de producir etanol mediante azúcares de fermentación liberados por endogulcanasas secretadas. Lundbeck et al. (Supra) expresó una forma truncada de la sialidasa A que era capaz de eliminar residuos de ácido siálico de muteínas de eritropoyetina recombinante. La modificación de una célula huésped de mamífero capaz de expresar un anticuerpo terapéutico u otra proteína que contiene Fc y desialilación simultánea de esa proteína expresada en el medio extracelular no se ha demostrado. La invención demuestra que la forma soluble de sialidasa A se puede coexpresar por las células productoras de anticuerpos, y el producto anticuerpo resultante recuperado a partir de cultivos de dichas células ha reducido el contenido de ácido siálico en su parte Fc de las moléculas. Los anticuerpos mejorados de ácido siálico producidos de esta manera han mejorado la actividad de ADCC en comparación con los anticuerpos producidos por las líneas celulares convencionales.

#### Caracterización estructural de las variantes de ácido siálico

65 **[0045]** Para la caracterización estructural de las variantes de ácido siálico que contienen oligosacáridos, las preparaciones de glicoproteína incluidas las preparaciones de anticuerpos fueron tratadas con péptido - N -

glicosidasa F para liberar los oligosacáridos unidos a N -. La enzima péptido - N - glucosidasa F (PNGasa F) escinde asparagines unidos a oligosacáridos. Los oligosacáridos liberados se marcaron fluorescentemente con ácido antranílico (ácido 2 - aminobenzoico), se purificaron y se analizaron por HPLC como se describe (véase Anumula, K. R. y Dhume ST *Glycobiology* 1998 julio; 8 (7): 685 - 94). Como se muestra en la Figura 3, los oligosacáridos separados como G0, G1, G2, G2S1 y G2S2 en el cromatograma se pueden detectar y cuantificar. La especies aglicosiladas, naturalmente desprovistas de glicanos o que han sido despojadas química o enzimáticamente de glicanos se denominan Gno.

### Caracterización Biológica de las variantes de ácido siálico

[0046] Las proteínas que contienen Fc se pueden comparar por funcionalidad mediante varios ensayos *in vitro* bien conocidos. En particular, la afinidad para los miembros de la familia de los receptores de Fc $\gamma$ , Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII es de interés. Estas mediciones se podrían realizar utilizando formas solubles recombinantes de los receptores o las formas asociadas a células de los receptores. Además, la afinidad para FcRn, el receptor responsable de la semivida prolongada en circulación de IgG se puede medir, por ejemplo, mediante BIAcore usando FcRn soluble recombinante. Ensayos funcionales basados en células, como los ensayos de ADCC y ensayos de los CDC, proporcionan una visión de las consecuencias funcionales probables de determinadas estructuras variantes. En una realización, el ensayo de ADCC está configurado para tener células NK que actúan como la célula efectora primaria, reflejando así los efectos funcionales en el receptor de Fc $\gamma$ RIII. Los ensayos de fagocitosis también se pueden usar para comparar las funciones efectoras inmunes de diferentes variantes, como ensayos CaN que miden las respuestas celulares, tales como la liberación de mediador superóxido o inflamatorios.

#### *Ensayos de afinidad y severidad*

[0047] Los anticuerpos, que son naturalmente multivalentes, pueden ser probados para determinar varios parámetros de la unión a proteínas diana. Un formato conveniente para la determinación de una Kd aparente es el ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) o RIA (radioinmunoensayo). "ELISA" se ha convertido en un método generalmente utilizado para referirse a un ensayo de unión realizado en un soporte sólido usando métodos de detección indirecta. Generalmente, en un ELISA, los analitos solubles se eliminan de la solución después de unirse específicamente a los reactivos en fase sólida. En el método, los reactivos de fase sólida se preparan mediante la adsorción de un antígeno o anticuerpo en placas de microtitulación de plástico; En otros métodos, los reactivos de fase sólida son moléculas asociadas a células. En todos los protocolos, los reactivos de fase sólida se incuban con reactivos secundarios o terciarios covalentemente acoplados a una enzima. Los conjugados no unidos se eliminan mediante lavado y se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico. A medida que el sustrato es hidrolizado por la enzima conjugado unido, se genera un producto coloreado o fluorescente. Finalmente, el producto se detecta visualmente o con un lector de placas de microtitulación. La intensidad de la señal generada es proporcional a la cantidad de analito inicial en la mezcla de ensayo.

[0048] En una variación del ensayo en fase sólida, un antígeno puede ser inmovilizado indirectamente o capturado, por ejemplo, utilizando un anticuerpo de captura inmovilizado que reconoce un dominio irrelevante en el antígeno o mediante el uso de un anticuerpo u otro ligando que se une a una "etiqueta" mediante modificación genética en la proteína diana, por ejemplo, una secuencia de polihistidina.

[0049] Un método alternativo para medir la unión de anticuerpos contra antígenos de superficie es mediante el uso de células enteras que expresan (natural o mediante modificación genética) un antígeno en la superficie celular. Las células se incuban con una solución de prueba que contiene el anticuerpo primario. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y las células se incuban a continuación con una enzima conjugada con anticuerpos específicos para el anticuerpo primario. La enzima conjugada no unida se elimina mediante lavado y se agrega solución de sustrato. El nivel de anticuerpo primario unido es proporcional a la cantidad de hidrólisis del sustrato. Esta será cuantitativa si el número de células por unidad de volumen se mantiene constante. Como alternativa, puede hacerse la detección utilizando un ligando radiomarcado a través de unión directa o competición como se describió anteriormente. Los protocolos para los ensayos de ELISA se encuentran en, por ejemplo, Ausubel, FM et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2003 John Wiley & Sons, Inc.

[0050] La velocidad de unión, las velocidades de asociación y velocidades de disociación también se pueden medir usando la tecnología BIAcore que utiliza un aglomerante en fase sólida o un ligando y un aglomerante en fase de solución móvil o un ligando detectado por resonancia de plasmón superficial.

#### *Métodos para la evaluación de la función efectora*

[0051] El papel de la glicosilación de anticuerpos en la depuración, y por lo tanto, la farmacocinética de las proteínas que contienen Fc terapéutico parece mínima; la unión al receptor Fc neonatal (FcRn) se consideró responsable de la eliminación de la IgG de la circulación, parece que no se altera por la falta del oligosacárido N - ligado en la parte Fc de un anticuerpo.

**[0052]** Los receptores Fc de Ila gG (FCR) que enlazan las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos de IgG con funciones efectoras celulares incluyen los receptores Fc - gamma: FcRI (CD64), FcRII (CD32) (FcRIIA y FcRIIB), y FcRIII (CD16) . Los tres se encuentran en monocitos. Sin embargo, la elaboración de estos receptores en las diferentes células diana parece ocurrir diferencialmente y en respuesta a otros factores. Por lo tanto, la medición de la afinidad de Fc modificado con glicosilación contiene bioterapéuticos para los receptores Fc – gamma, es una medición apropiada para la predicción de las funciones efectoras mejoradas.

**[0053]** Se ha indicado que los Abs de IgG1humanas con bajos niveles de fucosa en sus glicanos Fc tienen una mayor afinidad para FcR CD16 humano y mejoraron de manera espectacular en la actividad *in vitro* en los ensayos ADCC utilizando células efectoras CMSPs humanas (Shinkawa et al. J. Biol. Chem. 278 (5): 3466 - 3473, 2003; Escudos et al. J Biol Chem. 277 (30): 26733 - 26740, 2002; Umaña et al., Nat. Biotech 17: 176 - 180,1999).

**[0054]** Un método de evaluación de las funciones efectoras utilizando el ensayo ADCC *in vitro* se puede realizar de una manera cuantitativa. Por lo tanto, un ensayo *in vitro* puede diseñarse para medir la capacidad del anticuerpo unido para provocar la destrucción de la célula que muestra su ligando afín para la correcta selección de las líneas celulares efectoras y diana y la evaluación de las células "asesinas" ya sea por la incapacidad de las células para seguir dividiendo o por la liberación de los contenidos internos, por ejemplo, liberación de Cr<sup>51</sup>. La célula diana puede ser una línea celular que normalmente expresa un ligando diana para el anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o una proteína de fusión o se pueden modificar para expresar y retener la proteína diana en su superficie. Un ejemplo de dicha línea de celular modificada es la célula K2, una línea celular de mieloma de ratón Sp2 / 0 que se expresa de forma estable en el FNT humano recombinante superficial que permanece como forma de transmembrana debido a la introducción de una delección de 1-12 aminoácidos de la citoquina madura (Pérez et al., Cell 63: 251 - 258, 1990). Esta línea celular es útil para evaluar las alteraciones en la actividad ADCC de los anticuerpos anti -FNT, de los fragmentos de los anticuerpos, o de las proteínas de fusión que se dirigen al anti – FNT alfa modificado que tiene dominios Fc o actividad en el dominio Fc.

**[0055]** Las células efectoras para el ensayo de actividad ADCC *in vitro* pueden ser CMSP (células monocíticas de sangre periférica) de fuente humana o de otro mamífero. Las células efectoras de CMSP pueden aislarse justo después de la extracción de sangre de los donantes por los métodos aprobados. Otras células monocíticas o de macrófagos que se pueden usar son las derivadas de los fluidos de efusión, tales como exudados peritoneales.

**[0056]** Están también disponibles los modelos *in vivo* para la medición de las funciones inmunes celulares. Por ejemplo, los anticuerpos anti - CD3 pueden usarse para medir la activación de células T en ratones, ya que la activación de células T depende de la manera en la que el dominio Fc del anticuerpo se acopla a los receptores específicos Fcγ. *In vitro*, se comparará la actividad anti - tumoral de una versión de fucosa elevada y una baja de un híbrido de Ab de IgG1 humana contra el receptor 4 de quimiocinas CC, no se observó diferencias en su actividad ADCC *in vitro* (utilizando células efectoras de ratón), sin embargo, el Ab de baja fucosa mostró una eficacia más potente *in vivo*. No se proporcionaron células efectoras humanas y los ratones retuvieron las células NK endógenas (Niwa et al. Cancer Res. 64: 2127 - 2133, 2004). Como el receptor CD16 en las células NK humanas ha demostrado una mayor sensibilidad en los niveles de fucosa de los Abs de IgG1, estos datos sugieren que un mecanismo distinto de lo que se ha estudiado en las células efectoras humanas está funcionando en ratones. Una posibilidad es el receptor CD16 – 2 de ratón descubierto recientemente (Mechetina et al. Inmunógeno 54: 463 - 468, 2002). El dominio extracelular del ratón CD16 - 2 tiene una identidad de secuencia significativamente más alta en el CD16A humana (65%) que la del receptor CD16 de ratón que mejor se conoce, lo que sugiere que puede ser más sensible a los niveles de fucosa de las IgG qu cuando se se une a CD16 de ratón. Su expresión se indica en las células J774 de tipo macrófago en ratón, es consistente con la posibilidad de que los macrófagos de ratón que expresan CD16 - 2 puedan ser responsables de la mayor actividad anti - tumoral por el Ab de baja fucosa descrito por Niwa et al. (2004). Por lo tanto, el estudio de la unión al receptor Fc por las proteínas que contienen Fc de tipo IgG1 humana en las células efectoras murinas no es predictiva.

#### **Procesos de producción de proteínas**

**[0057]** Diferentes procesos involucrados con la producción de proteínas que contienen Fc pueden afectar a la estructura de oligosacáridos Fc, incluyendo el ácido siálico. En una realización, las células huésped que secretan la proteína que contiene Fc se cultivan en presencia de suero, por ejemplo, suero bovino fetal (SBF), que no se sometió anteriormente a un tratamiento de calor elevado (por ejemplo, 56 °C durante 30 minutos). Esto puede dar como resultado una proteína que contiene Fc que no contiene, o contiene cantidades muy bajas, ácido siálico, debido a la presencia natural en el suero de las enzimas de sialidasa activas que pueden eliminar el ácido siálico de las proteínas que contienen Fc secretadas a partir de esas células. En otra realización, las células que secretan la proteína que contiene Fc se cultivan en presencia de suero que se sometió a un tratamiento de calor elevado, inactivando así las enzimas sialidasa, o en ausencia de suero o de otros componentes del medio que pueden contener enzimas sialidasa, de tal manera que la proteína que contiene Fc tiene los niveles más altos de ácido siálico, para aplicaciones (por ejemplo, indicaciones terapéuticas) cuando podría ser deseable.

**[0058]** En otra realización, se establecieron las condiciones utilizadas para purificar y los procesos adicionales de proteínas que contienen Fc que favorecerán al contenido óptimo de ácido siálico. Por ejemplo, ya que el ácido siálico

es lábil al ácido, la exposición prolongada a un bajo entorno de pH, por ejemplo después de la elución de una columna de cromatografía de proteína A o durante los procesos de inactivación viral, puede dar lugar simultáneamente a una reducción en el contenido de ácido siálico.

## 5 Células huésped modificadas

[0059] Tal y como se describe en la presente, la célula huésped elegida para la expresión de la proteína que contiene Fc recombinante o anticuerpo monoclonal es una importante contribuyente a la composición final, incluyendo, sin limitación, la variación en la composición de los restos de oligosacáridos que decoran la proteína en el dominio CH2 de la inmunoglobulina. Por lo tanto, un aspecto de la invención implica la selección de células huésped apropiadas para su uso y / o desarrollo de una célula de producción que expresa la proteína terapéutica deseada.

[0060] En una realización, la célula huésped es una célula naturalmente deficiente o carente de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped se modifica o se trata genéticamente con el fin de ser desprovista de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped es una línea de células huésped derivada seleccionada para expresar niveles reducidos o indetectables de sialiltransferasas. En otra realización, la célula huésped está naturalmente desprovista de, o está modificada o tratada genéticamente para ser desprovista de, la sintetasa de ácido siálico CMP, la enzima que cataliza la formación de ácido siálico CMP, que es la fuente de ácido siálico utilizada por la sialiltransferasa para transferir ácido siálico al anticuerpo. En una realización relacionada, la célula huésped puede estar naturalmente desprovista de, o está modificada o tratada genéticamente para ser desprovista de, la sintetasa de ácido pirúvico, la enzima que forma ácido siálico a partir de ácido pirúvico.

[0061] En una realización adicional, la célula huésped puede estar naturalmente desprovista de, o está modificada o tratada genéticamente para ser desprovista de, galactosiltransferasas, de tal manera que los anticuerpos expresados en dichas células carecen de galactosa. Sin galactosa, no se unirá el ácido siálico. En una realización aparte, la célula de la célula huésped puede sobreexpresarse naturalmente, o ser modificada genéticamente para sobreexpresar, una enzima sialidasa que elimina el ácido siálico de los anticuerpos durante la producción. Dicha enzima sialidasa puede actuar intracelularmente en anticuerpos antes de que los anticuerpos se secreten o estén secretados en el medio de cultivo y actúe sobre los anticuerpos que ya han sido secretados en el medio. Los métodos de selección de líneas celulares con glicosilasas alteradas y que expresan glicoproteínas con composiciones de carbohidratos alterados se han descrito en (Ripka y Stanley, 1986 Somatic Cell Mol Gen 12: 51 - 62;. US2004 / 0132140). Los métodos de células huésped modificadas para producir anticuerpos con patrones de glicosilación alterados dan lugar a una ADCC mejorada que se ha demostrado en, por ejemplo la Patente U.S. 6.602.864, en la que las células huésped albergan un ácido nucleico que codifica al menos una glicoproteína que modifica la glicosiltransferasa, específicamente  $\beta$  (1,4) - N - acetil - glucosaminil - transferasa III (GnTIII).

[0062] Otros enfoques para la modificación genética de las propiedades de glicosilación de una célula huésped mediante la manipulación de la glicosiltransferasa de la célula huésped implica la eliminación o supresión de la actividad, como se indica en el documento EP1. 176.195, específicamente, alfa, 6 fucosiltransferasa (producto génico FUT8). Sería obvio para un experto en la técnica poner en práctica los métodos de modificación de células huésped en otro de los ejemplos específicos citados anteriormente. Además, la célula huésped modificada puede ser de origen mamífero o se puede seleccionar de los grupos formados por mieloma, linfoma, levadura, células de insecto o vegetales, o cualquier células derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.

[0063] En otra realización, el método de supresión o eliminación de la actividad de la enzima requiere la unión de ácido siálico que puede seleccionarse del grupo formado por silenciamiento génico, tal como el uso de siRNA, *knockout* genético, o adición de un inhibidor enzimático, tal como la co - expresión de un Ab intracelular o péptido específico para la enzima que une y bloquea su actividad enzimática, y otras técnicas de modificación genética conocidas. En otra realización, un método para mejorar la expresión o la actividad de una enzima que bloquea la unión de ácido siálico, o una enzima sialidasa que elimina los ácidos siálicos que ya están unidos, puede seleccionarse del grupo formado por transfecciones con genes de enzimas recombinantes, factores de transfecciones o de transcripción que mejoran la síntesis de ARN de la enzima, o las modificaciones genéticas que mejoran la estabilidad del ARN de la enzima, dando lugar a una mayor actividad de las enzimas, tales como sialidasas, que dan lugar a niveles más bajos de ácido siálico en el producto purificado. En otra realización, los inhibidores de enzimas específicas se pueden añadir al medio de cultivo celular.

## Anticuerpos

[0064] Un anticuerpo descrito en el presente documento puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, tales como, pero no limitándose a, un ser humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, o cualquier combinación de los mismos e incluye anticuerpos de humanos aislados, primates, roedores, mamíferos, híbridos, humanizados y / o anticuerpos anti - integrina injertados en CDR, inmunoglobulinas, productos de escisión y otras partes especificadas y variantes de los mismos. La descripción también se refiere a la codificación de anticuerpos o ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales

transgénicos, plantas transgénicas, y métodos de fabricación y utilización de los mismos, tal y como se describe en el presente documento conjuntamente junto a lo que se conoce en la técnica.

5 **[0065]** La presente invención proporciona además células, líneas celulares, y cultivos celulares que expresan una inmunoglobulina o fragmento de los mismos capaces de la glicosilación en un dominio CH2 que se une un antígeno, una citoquina, una integrina, un anticuerpo, un factor de crecimiento, un antígeno de superficie que es un marcador de linaje y diferenciación celular, una hormona, una proteína receptora o de fusión de la misma, una proteína de sangre, una proteína implicada en la coagulación, cualquier fragmento de las mismas, y cualquier análogo estructural o funcional de cualquiera de los anteriores. En una realización preferida, la inmunoglobulina, fragmento o derivado del mismo se une a un antígeno en la superficie de una célula diana. En una realización particularmente preferida, la célula diana es una célula tumoral, una célula de la vulturación del tumor, o una célula inmune. En una realización específica, la inmunoglobulina, fragmento o derivado del mismo se une a FNT, una integrina, un antígeno de células B, o un factor tisular.

15 **[0066]** En otra realización, las células, líneas celulares, y cultivos celulares de la presente invención pueden expresar de forma detectable una proteína de fusión que comprende un factor de crecimiento u hormona. Ejemplos de los factores de crecimiento contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un factor de crecimiento humano, un factor de crecimiento derivado de plaquetas, un factor de crecimiento epidérmico, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento nervioso, una gonadotropina coriónica humana, una eritropoyetina, una trombopoyetina, una proteína morfogénica ósea, un factor de crecimiento transformante, un factor de crecimiento similar a la insulina, o un péptido similar al glucagón, y cualquier análogo estructural o funcional de los mismos.

25 **[0067]** Los anticuerpos aislados de la invención incluyen aquellos que tienen isotipos de anticuerpos con actividad ADCC, especialmente IgG1 humana, (por ejemplo, IgG1kappa y IgG1lamda), y, menos preferidos son IgG2 e IgG3, o isotipos híbridos que contienen residuos alterados en los residuos específicos en los dominios Fc que son sus homólogos de otras especies. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos (por ejemplo, IgG1) o pueden incluir sólo una parte de unión al antígeno y una parte Fc o dominio capaz de obtener funciones efectoras incluyendo ADCC, activación del complemento, y unión de C1q.

30 **[0068]** Además, el fragmento de inmunoglobulina producido por las células, líneas celulares, y cultivos celulares de la presente invención puede incluir, pero no está limitado a Fc u otras estructuras que contienen dominio CH2 y cualquier análogo estructural o funcional de los mismos. En una realización, el fragmento de inmunoglobulina es un polipéptido de fusión del dominio receptor dimérico. En una realización específica, el polipéptido de fusión del dominio receptor dimérico es Etanercept. El etanercept es una molécula recombinante, soluble del receptor FNT  $\alpha$  que se administra por vía subcutánea y se une a TNF $\alpha$  en el suero del paciente, volviéndolo biológicamente inactivo. El etanercept es una proteína de fusión dimérica que consiste en la parte de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (RFNT) humano de 75 kilodaltones (p75) ligado a la parte Fc de la IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra, pero no el dominio CH1 de la IgG1.

45 **[0069]** Otros productos dispuestos para su fabricación utilizan las líneas celulares de la invención que incluyen proteínas terapéuticas o profilácticas actualmente fabricadas por otros tipos de líneas celulares animales y que tienen un CH2 capaz de ser glicosilado. Particularmente preferidas son aquellas proteínas terapéuticas, glicosiladas, proteínas que contienen dominio CH2 que se unen a antígenos diana en una superficie celular, esta célula es conveniente para incapacitar o eliminar del cuerpo. Un número de dichos anticuerpos terapéuticos está modificado para contener la IgG1 humana, especialmente la IgG1, la cadena pesada que comprende un dominio CH1, CH2 y CH3 humano. Tales proteínas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a las descritas a continuación en la presente.

50 **[0070]** El infliximab se vende ahora como REMICADE®. Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico de la IgG1k con un peso molecular aproximado de 149.100 daltones. Se compone de regiones constantes humanas y regiones variables murinas. Infliximab se une específicamente al factor de necrosis tumoral humano alfa (FNT (alfa)) con una constante de asociación de  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Infliximab neutraliza la actividad biológica del FNT (alfa) mediante la unión con alta afinidad a las formas solubles y de membrana del FNT (alfa) e inhibe la unión del FNT (alfa) con sus receptores. Las células que expresan la membrana del FNT (alfa) unido por infliximab se pueden lisar *in vitro* o *in vivo*. El infliximab está indicado para el tratamiento de la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, y espondilitis alquilosante. Infliximab se administra en dosis de 3 a 5 mg / kg administradas como una infusión intravenosa, seguida con dosis similares adicionales a las 2, 6, y / o 8 semanas a partir de entonces, y a intervalos cada 8 semanas, dependiendo de la enfermedad a tratar. Daclizumab (vendido como Zenapax®) es un inmunosupresor, un anticuerpo monoclonal de IgG1 humanizado producido por tecnología de ADN recombinante que se une específicamente a la subunidad alfa (alfa p55, CD25, o subunidad Tac) del receptor de la interleucina -2 de alta afinidad humano (IL - 2 ) que se expresa en la superficie de los linfocitos activados. Daclizumab es un anticuerpo híbrido de ratón – humano injertado en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las secuencias humanas se derivaron de los dominios constantes de la IgG1 humana y las regiones marco variables del anticuerpo de mieloma Eu. Las secuencias murinas se derivaron de las CDRs de un anticuerpo anti - Tac murino. Daclizumab está indicado para la profilaxis del rechazo agudo de órganos en pacientes que reciben trasplantes

renales y se utiliza generalmente como parte de un régimen inmunosupresor que incluye ciclosporina y corticosteroides.

5 **[0071]** El basiliximab (vendido como SIMULECT®) es un anticuerpo monoclonal híbrido (murino / humano) producido por la tecnología de ADN recombinante, que funciona como un agente inmunosupresor, que se une específicamente a y bloquea el receptor de la interleucina - 2 (alfa) - cadena (IL -2R (alfa), también conocido como antígeno CD25) en la superficie de los linfocitos T activados. Basándose en la secuencia de aminoácidos, el peso molecular calculado de la proteína es de 144 kilodaltones. Es una glicoproteína obtenida a partir de la fermentación de una línea celular de mieloma de ratón establecida por modificación genética para expresar plásmidos que contienen los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera humana (IgG1) y los genes de la región variable de la cadena ligera y pesada de ratones que codifica el anticuerpo RFT5 que se une selectivamente a la IL - 2R (alfa). El basiliximab está indicado para la profilaxis del rechazo agudo de órganos en pacientes que recibieron un trasplante renal cuando se utilizó como parte de un régimen inmunosupresor que incluye ciclosporina y corticosteroides.

15 **[0072]** El adalimumab (vendido como HUMIRA®) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humana recombinante específico para el factor de necrosis tumoral humano (FNT). El adalimumab se ha creado utilizando la tecnología de expresión in vitro dando lugar a un anticuerpo con regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de humanos y regiones constantes kappa de IgG1 humana. HUMIRA® está indicado para reducir los signos y síntomas e inhibir la progresión del daño estructural en pacientes adultos con artritis reumatoide de moderada a severamente activa que han tenido una respuesta inadecuada a uno o más DMARDs. HUMIRA® puede utilizarse solo o en combinación con MTX u otros DMARDs.

25 **[0073]** El rituximab (vendido como RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal híbrido murino / humano modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos. El anticuerpo es una inmunoglobulina kappa IgG1 que contiene secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada murina y las secuencias de la región constante humana. Rituximab tiene una afinidad de unión para el antígeno CD20 de aproximadamente de 8,0 nM. Rituximab está indicado para el tratamiento de los pacientes con bajo grado o folicular en recidiva o resistente, CD20 positivo, linfoma no Hodgkin de células B. RITUXAN® se administra en una infusión IV de 375 mg / ml una vez por semana durante 4 u 8 dosis.

35 **[0074]** El trastuzumab (comercializado como Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado derivado de ADN que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de la proteína del receptor - 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2. El anticuerpo es una IgG kappa 1 que contiene regiones marco humanas con las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se une a HER2. Herceptin está indicado como terapia de agente único para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica. Herceptin® en combinación con paclitaxel está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2 y que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica. La dosis recomendada es una dosis de carga inicial de 4 mg / kg de trastuzumab administrada como una infusión de 90 minutos y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg / kg de trastuzumab que se puede administrar como una infusión de 30 minutos si la dosis de carga inicial es bien tolerada.

45 **[0075]** El alemtuzumab (vendido como CAMPATH®) es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante (Campath - 1H) que se dirige contra la glicoproteína de la superficie celular 21 - 28 kD, CD52. El alemtuzumab se une a CD52, un antígeno no modular que está presente en la superficie de esencialmente todos los linfocitos B y T, la mayoría de los monocitos, macrófagos, y células NK, una subpoblación de granulocitos, y tejidos del aparato reproductor masculino. El anticuerpo Campath - 1H es una IgG1 kappa humana con marco variable y regiones constantes, y las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo monoclonal murino (rata) (Campath - 1G). Campath está indicado para el tratamiento de las células B de leucemia linfocítica crónica (LLC - B) en pacientes que han sido tratados con agentes alquilantes y que han fracasado en el tratamiento con fludarabina. La determinación de la eficacia de Campath se basa en tasas de respuesta global. Campath es administrado inicialmente como una infusión IV de 3 mg cada 2 horas al día; una vez que se tolera la dosis diaria debe aumentarse a 10 mg y continuar hasta su toleración. Una vez que este nivel de dosis es tolerado, la dosis de mantenimiento de Campath de 30 mg puede iniciarse y administrarse tres veces por semana durante un máximo de 12 semanas. En la mayoría de los pacientes, el incremento de 30 mg se puede lograr en 3 - 7 días.

60 **[0076]** El omalizumab (vendido como XOLAIR®) es un anticuerpo monoclonal de IgG 1 (kappa) humanizado recombinante que se une selectivamente a la inmunoglobulina E humana (IgE). Omalizumab inhibe la unión de la IgE al receptor de alta afinidad de IgE (Fc (épsilon) RI) en la superficie de los mastocitos y basófilos. La reducción de la IgE unida a la superficie de las células portadoras de Fc (épsilon) RI limita el grado de liberación de los mediadores de la respuesta alérgica. El tratamiento con omalizumab también reduce el número de Fc (épsilon) de los receptores RI en los basófilos en pacientes atópicos. El omalizumab está indicado para adultos y adolescentes (mayores de 12 años) con asma persistente de moderado a severo que tienen una prueba cutánea positiva o

reactividad in vitro a aeroalérgenos perennes y cuyos síntomas están adecuadamente controlados con corticosteroides inhalados. Omalizumab se administra SC cada 2 o 4 semanas con dosis de 150 a 375 mg.

5 **[0077]** El efalizumab (RAPTIVA ®) es un anticuerpo de isotipo kappa monoclonal inmunosupresor de IgG1 recombinante humanizada que se une al CD11a humano. El efalizumab se une al CD11a, la (alfa) subunidad de la función de leucocitos antígeno - 1 (LFA - 1), que se expresa en todos los leucocitos, y disminuye la expresión de la superficie celular de CD11a. Efalizumab inhibe la unión de LFA - 1 a la molécula de adhesión intercelular - 1 (ICAM - 1), inhibiendo de este modo la adhesión de los leucocitos a otros tipos de células. La interacción entre LFA - 1 e ICAM - 1 contribuye a la iniciación y al mantenimiento de múltiples procesos, incluyendo la activación de los linfocitos T, la adhesión de los linfocitos T a las células endoteliales, y la migración de los linfocitos T a los sitios de inflamación, incluyendo la piel psoriásica. La activación de linfocitos y el tráfico a la piel desempeñan un papel en la fisiopatología de la psoriasis crónica en placas. En la piel psoriásica, la expresión en la superficie celular de ICAM - 1 está regulada positivamente en el endotelio y queratinocitos. CD11a también se expresa en la superficie de los linfocitos B, monocitos, neutrófilos, células asesinas naturales, y otros leucocitos. Por lo tanto, existe la posibilidad de que efalizumab afecte a la activación, adhesión, migración, y al número de células que no son linfocitos T. La dosis recomendada de RAPTIVA ® es una dosis única de 0,7 mg / kg SC acondicionada seguida de dosis subcutáneas semanales de 1 mg / kg SC (la dosis única máxima no puede exceder un total de 200 mg).

20 **[0078]** En otra forma de realización, una línea celular de la invención se transfecta de forma estable o modificada de otra manera para expresar un polipéptido derivado que no es inmunoglobulina, pero que se incluye dentro de la definición de una proteína que contiene Fc.

25 **[0079]** Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y proteínas se pueden derivar de varias maneras bien conocidas en la técnica. En un aspecto, los anticuerpos se obtienen convenientemente a partir de hibridomas preparados por inmunización de un ratón con los péptidos de la invención. Los anticuerpos, por tanto, pueden obtenerse usando cualquiera de las técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Ausubel, et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY (1987 - 2001); Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Harlow y Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Colligan, et al, eds, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (1997 - 2001).

35 **[0080]** En otro método conveniente para obtener la parte de unión a la diana del anticuerpo, normalmente los dominios variable pesado y / o variable ligero de un anticuerpo, estas partes se seleccionan de una biblioteca de tales dominios de unión creada en, por ejemplo, una biblioteca de fagos. Una biblioteca de fagos puede ser creada mediante la inserción de una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o de una biblioteca de polinucleótidos que contienen secuencias de interés, como a partir de las células B de un animal inmunizado o humano (Smith, G. P. 1985 Science 228: 1315 - 1317). Las bibliotecas de anticuerpos de fagos contienen pares de regiones variables de cadena pesada (H) y ligera (L) en un fago que permite la expresión de fragmentos Fv de cadena sencilla o fragmentos Fab (Hoogenboom, et al. 2000, Immunol. Hoy en día 21 (8) 371-8). La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede ser manipulada para aumentar y / o alterar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar anticuerpos humanos monoclonales, adicionales y deseables. Por ejemplo, la molécula de inmunoglobulina de la cadena pesada (H) y de cadena ligera (L) que codifican los genes pueden ser mezcladas al azar (barajado) para crear nuevos pares de HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Además, cualquiera o ambos de H y L de codificación de los genes de la cadena pueden mutagenizar en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina, y posteriormente examinarse por la afinidad deseable y las capacidades de neutralización. Las bibliotecas de anticuerpos también pueden ser creadas sintéticamente mediante la selección de una o más secuencias de armazón humanas y la introducción de colecciones de casetes de CDR derivadas de repertorios de anticuerpos humanos o mediante variación diseñada (Kretzschmar y von Ruden 2000, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:598-602). Las posiciones de la diversidad no se limitan a las CDR, sino que también pueden incluir los segmentos de marco de las regiones variables o pueden incluir distintas regiones variables de anticuerpos, tales como péptidos.

55 **[0081]** Otras bibliotecas de componentes de unión diana que pueden incluir distintas regiones variables de anticuerpos son la expresión en ribosoma, la expresión en levadura, y la expresión en bacterias. La expresión en ribosoma es un método de traducción de ARNm en sus proteínas similares mientras se mantiene la proteína unida al ARN. La secuencia de codificación de ácido nucleico se recupera mediante RT - PCR (Mattheakis, LC et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci.. EE.UU. 91, 9022). La expresión en levadura se basa en la construcción de proteínas de fusión del receptor de adhesión a levadura mediante alfa aglutinina asociado a membranas, aga1 y aga2, una parte del sistema de tipo apareamiento (Broder et al. 1997. *Nature Biotechnology*, 15:553-7). La expresión en bacterias se basa en la fusión de la diana a proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o pared celular (Chen y Georgiou 2002. *Biotechnol Bioeng*, 79:496-503).

60

**[0082]** En comparación con la tecnología de hibridoma, el fago y otros métodos de presentación de anticuerpos permiten la posibilidad de manipular la selección contra el antígeno diana *in vitro* y sin la limitación de la posibilidad de efectos del huésped en el antígeno o viceversa.

## 5 Células huésped

**[0083]** Las células huésped descritas en la presente comprenden células huésped capaces de producir anticuerpos específicos con un contenido de ácido siálico definido en el contenido oligosacárido de dichos anticuerpos.

10 **[0084]** A diferencia de la mayoría de los genes que se transcriben a partir de las secuencias de ADN genómico, los genes de anticuerpos se unen a partir de segmentos génicos que pueden estar separados ampliamente en la línea germinal. En particular, se forman genes de cadena pesada por recombinación de tres segmentos genómicos que  
15 ligera funcional se forman uniendo dos segmentos génicos; uno codifica la región V y el otro codifica la región U / C. Se estimó que tanto los loci de la cadena pesada como los loci de la cadena ligera kappa contienen algunos segmentos génicos V (las estimaciones varían entre 100 s y 1000 s) que abarcan más de 1000 kb. Los locus lambda son, por el contrario, mucho más pequeños y se ha demostrado que abarcan aproximadamente 300 kb en el cromosoma 16 del ratón. Se compone de dos segmentos génicos variables y cuatro segmentos génicos de la región  
20 de unión / constante (U / C). La formación de un gen funcional requiere la recombinación entre un elemento V y un elemento U / C.

**[0085]** En la célula B en la que se produce de forma natural el anticuerpo, el control de la transcripción de los dos genes de cadena ligera kappa y pesada reordenados depende tanto de la actividad del promotor tisular específico  
25 aguas arriba de la región V como del potenciador tisular específico ubicado en el intrón de U – C. Estos elementos actúan en sinergia. Además, se ha identificado un segundo potenciador específico de células B en los locus de la cadena ligera kappa. Este potenciador adicional está ubicado en 9 kb aguas abajo de C<sub>kappa</sub>. Por lo tanto, el método de hibridoma para inmortalizar los genes de expresión del anticuerpo se basa en las secuencias promotoras y potenciadoras endógenas del linaje de células B parentales. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden expresarse en una célula huésped mediante la activación (por manipulación) en una célula huésped que contiene  
30 ADN endógeno que codifica un anticuerpo. Dichos métodos son ya conocidos en la disciplina, por ejemplo, como se describe en las patentes U. S. N° 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746, y 5.733.761.

**[0086]** La clonación de ADN genómico del anticuerpo en un vector artificial es otro método de creación de células huésped capaces de expresar anticuerpos. Sin embargo, la expresión de anticuerpos monoclonales detrás de un  
35 promotor fuerte aumenta las posibilidades de identificación de líneas celulares de alta producción y de obtención de rendimientos más altos de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden producirse en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica tal y como ya se conoce en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

40 **[0087]** Son ya conocidos los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, levaduras, sistemas de baculovirus, plantas y animales transgénicos. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la disciplina para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen proteínas glicosiladas intactas de  
45 células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de una cría de hámster (BKH), células de melanoma de ratón NSO y líneas celulares derivadas, por ejemplo, células de mieloma de rata SP2 / 0, YB2 / 0 (CACT CRL – 1662), células embrionarias humanas de riñón (HEK), células embrionarias humanas de retina, células PerC.6, células hep G2, BSC – 1 (por ejemplo, CACT CRL – 26) y muchas otras disponibles en, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Un huésped bacteriano común preferido es *E. coli*.  
50

**[0088]** Las células de mamífero tales como las células CHO, células de mieloma, células HEK293, células BHK (BHK21, CACT CRL – 10), células Ltk de ratón, y células NIH3T3 se han utilizado con frecuencia para la expresión estable de los genes heterólogos. Líneas celulares tales como Cos (COS – 1, CACT CRL - 1650; COS – 7, CACT  
55 CRL – 1651) y HEK293 se utilizan de forma rutinaria para la expresión transitoria de las proteínas recombinantes.

**[0089]** Las células huésped de mamífero preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes incluyen células de mieloma tales como Sp2 / 0, YB2 / 0 (CACT CRL – 1662), NSO, y P3X63.Ag8.653 (por ejemplo, SP2 / 0 – Ag14) debido a su elevada tasa de expresión. En particular, para su utilización con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS divulgado en los documentos WO 87/04462,  
60 WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes del anticuerpo se introducen en las células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.  
65



[0090] Las células CHO – K1 y DHFR – CHO, DG44 y DUK – B11 (G. Urlaub, L.A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4216 - 4220) se utilizan para la producción de proteínas de alto nivel debido a que la amplificación de los genes de interés se permite por la incorporación de un marcador amplificable, seleccionable, DHFR utilizando por ejemplo el fármaco metotrexato (MTX) (R.J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185: 537 - 566). Las células DHFR – CHO pueden utilizarse con éxito para producir mAbs recombinantes a un nivel elevado. Las DHFR – CHO pueden producir anticuerpos anti - MCP – 1 en una proporción de 80 – 110 mg de  $10^6$  células<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> o más de 200 mg  $10^6$  de células día<sup>-1</sup>. Una variedad de promotores se ha utilizado para obtener la expresión de las cadenas L y P en estas células CHO, por ejemplo, el promotor de la b – actina, el promotor humano CMV - MIE, el promotor tardío principal del Adenovirus (MLP), el promotor RSV, y el LTR del virus de la leucemia murina. Se describen un número de vectores para la expresión de anticuerpos en la literatura en la que dos cadenas de Ig son transportadas por dos plásmidos diferentes con un marcador seleccionable / amplificable independiente. Los vectores que contienen una cadena del anticuerpo, por ejemplo, la cadena P, ligada al marcador DHFR, y un casete de expresión de la cadena L con el marcador Neo<sup>r</sup> o viceversa se pueden utilizar para obtener hasta 180 mg de un mAb humanizado L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en matraces de agitación. Los métodos utilizados para la selección inicial y la amplificación posterior pueden variar y son bien conocidos por los expertos en la materia. En general, puede obtenerse una expresión de mAb de alto nivel utilizando los siguientes pasos: selección inicial y amplificación posterior de los clones candidatos, co - selección (por ejemplo, en casos donde los vectores de expresión de la cadena P como los de la cadena L transportan la unidad de expresión de DHFR) y amplificación, co - amplificación utilizando marcadores amplificables diferentes, y selección inicial y amplificación en cultivo masivo, seguido de la clonación por dilución para identificar los clones de alta expresión individuales. Debido a que los sitios de integración pueden influir en la eficiencia de la expresión de la cadena P y de la cadena L y la expresión de mAbs en general, se han creado vectores únicos en los que se colocan dos unidades de expresión de la cadena Ig en tándem. Estos vectores además pueden transportar un marcador seleccionable dominante como Neo<sup>r</sup> y el casete de expresión de DHFR. Para la revisión véase Ganguly, S. y A. Shatzman. *Expression Systems, mammalian cells* IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: *Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. 1999 de John Wiley & Sons, Inc.

[0091] Cockett et al. (1990. Bio / Technology 8, 662 - 667) desarrollaron el sistema GS para la expresión de alto nivel de los genes heterólogos en células CHO. La transfección de un vector de expresión que contiene un ADNc (bajo el control transcripcional del promotor hCMV) y un mini gen GS (bajo el control de un promotor tardío SV40) en células CHO – K1 (seguido por la selección con 20 mM en 500 mM de MSX) puede utilizarse para proporcionar clones que expresan los anticuerpos en rendimientos comparables a los de los sistemas DHFR – CHO. El sistema GS se analiza en su totalidad o en parte en relación con las Patentes Europeas N° 0 216 846, 0 256 055, y 0 323 997, y en la Solicitud de Patente Europea N° 89303964.4.

[0092] Mientras se describa la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se revelarán además en los siguientes ejemplos.

#### EJEMPLO 1: MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE GALACTOSILACIÓN Y SIALILACIÓN DE ANTICUERPOS

[0093] Se añadieron muestras de anticuerpo purificado de galactosilado a través del método enzimático bovino  $\beta$  – 1 – 4 galactosiltransferasa ( $\beta$ 1, 4GT) y UDP – Gal obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) a las muestras de anticuerpo. Se obtuvieron de  $\alpha$  – 2,3 – sialiltransferasa ( $\alpha$ 2, 3ST) de hígado de rata recombinante,  $\alpha$  – 1,3 – galactosiltransferasa recombinante ( $\alpha$ 1, 3GT) y CMP – Sia de Calbiochem (San Diego, CA). Se obtuvo PNGase F de New England Biolabs (Beverly, MA), de Prozyme (San Leandro, CA) o de Selectin BioSciences (Pleasant Hill, CA). Se obtuvieron  $\beta$  – Galactosidasa y  $\beta$  – glucosaminidasa de *Diplococcus pneumoniae* ya sea de ProZyme o de Selectin BioSciences. La  $\beta$  – Galactosidasa del riñón bovino y todas las otras enzimas procedían bien de ProZyme bien Selectin BioSciences. NAP – 5 y las columnas de proteína A HiTrap eran de Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Los otros reactivos eran de grado analítico.

[0094] Una forma enzimáticamente desglucosilada (denominada Gno) de Ab1 se preparó para servir como un anticuerpo de control que carece de función efectora inmune Fc. Esta variante se preparó tomando Ab1 (~ 10 mg en 1,0 mL de tampón) en 100 mM de tampón MES (pH 7,0) y se trató con 1000 U de PNGase F a 37 °C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de la enzima y se continuó con la incubación durante 24 horas adicionales. El Ab1 desglucosilado se purificó utilizando una columna de proteína A HiTrap y se formuló en TFS, pH 7,0. La glicofoma Gno se caracterizó por MALDI – TOF – MS para confirmar la desglucosilación.

[0095] Además de las preparaciones de Ab manipuladas en el laboratorio, también se compararon los subgrupos de Ab que difieren de forma natural en el contenido de ácido siálico, referido en la presente como “variantes naturales”. El anticuerpo no modificado se expresó en TFS de Ab1 después del material del grupo original que se intercambió a tampón en TFS. Los Abs monoclonales IgG1 humano, Ab1 y Ab3, en el que los miembros de un par difieren en los fines de la sialilación de Fc, al parecer debido a los diferentes procesos de producción utilizados para prepararlos (aunque producidos por el mismo tipo de célula huésped). Las variantes de Ab1, Ab1 – 20 y Ab1 – 29, contenían un 20 % y un 29 % de glicanos sialilados, respectivamente, y las variantes Ab5, Ab5 – 20 y Ab5 – 26 contenían respectivamente un 0 % y un 26 % de glicanos sialilados. De lo contrario, los miembros de cada par tenían las mismas secuencias aminoácidas, los mismos niveles de fucosilación Fc y el contenido GlcNAc de la

bisectriz (análisis de espectrometría de masas MALDI – TOF), y el mismo nivel bajo de agregados de Ab (< 1 % por análisis de SEC – HPLC).

5 **[0096]** Se resumen en la Tabla 1 las preparaciones de Ab y de proteínas que contienen Fc utilizadas en los diversos bioensayos y la manera en la que se derivan.

**Tabla 1. Lista de resumen de la prueba de las preparaciones de las proteínas que contienen Fc utilizadas en la presente**

	<u>Anticuerpo parental</u>	<u>Variante específica</u>	<u>% de sialilación</u>	<u>Descripción</u>
10	Ab1	-	-	Anticuerpo de IgG1 humana anti - FNT
		Ab1 no modificado, Ab1 - 29	29	En la formulación original, variante de ácido siálico natural
15		Ab1 Gno	N.A	Desglicosilado enzimáticamente
		TFS de Ab	29	No modificado, tampón intercambiado en TFS
20		Ab1-20	20	Variante de ácido siálico natural
		Ab1MAAB	43	Unido a la columna de lectina MAA
		Ab1WGAB	32	Unido a la columna de lectina WGA
25		Ab1WGAR	40	Retrasado por la columna de lectina WGA
		Ab1WGAT	29	Pasó a través de la columna de lectina WGA
		Ab1-WGAR-41	41	Retrasado por la columna de lectina WGA
30		Ab1-WGAT-29	29	Pasó a través de la columna de lectina WGA
		Ab1 G2	0	Modificado enzimáticamente en galactosilación completa
		Ab1 G2S2(al)	95	Modificado enzimáticamente en G2S2
35		Ab1 G2S2(ba)	33	G2S2 perdió la mayor parte del ácido siálico
	Ab 2	-	-	Anticuerpo de IgG1 humana anti - FNT
40		Ab2 no modificado	5 %	No modificado; utilizado en la unión FcγRI, Figura 6
		Ab2 G2	0 %	Modificado; utilizado en el estudio de la PK de ratón, Figura 8
45		Ab2 G2S2	~ 90 %	Modificado; utilizado en el estudio de la PK de ratón, Figura 8
		Ab2 AlaAla	No es relevante	Mutante anti - TNF que carece de afinidad para FcγR
		Ab2 GT-WGAT	5	Pasó a través de la columna de lectina WGA
50		Ab2 GT-WGAR	67	Galactosilado y unido a la columna de lectina WGA
	Ab3	-	-	Específico para la subunidad de citoquina
		Ab3(ba)	2	Variante de ácido siálico natural
55		Ab3(al)	42	Variante de ácido siálico natural
	Ab4	Ab4	-	IgG1 de ratón (carece de afinidad para FcγRI humano)
60	Ab5	Ab5		Se une al receptor de superficie celular heterodimérico
		Ab5-0	0	Variante natural de glicosilación
		Ab5-26	26	Variante natural de glicosilación
65	FcP1		-	Contiene Fc, sin proteína de Ab

**[0097]** Todas las muestras de ensayo contienen una bisagra de IgG1 humana, y dominios CH2 y CH3. Ab1, Ab2, Ab3 y Ab5 son Abs monoclonales de IgG con IgG1 humana y regiones constantes kappa. El Ab1 es un Ab humano completo específico para el FNT humano y el Ab2 es un Ab quimérico de ratón / humano específico para el FNT humano. El Ab3 es un Ab humano completo específico para una de las subunidades de un citoquina proinflamatoria heterodimérica. Los cuatro Abs se expresaron en células de mieloma de ratón Sp2 / 0 transfectadas. El Ab5 es un anticuerpo completo humano dirigido a una subunidad de un receptor de superficie celular heterodimérico. FcP1 es una proteína de fusión dimérica que comprende la bisagra de IgG1 humana y los dominios CH2 y CH3.

**[0098]** Las glicofomas G2 se prepararon sometiendo muestras de IgG en 100 mM de tampón MES (pH 7,0) (~ 10 mg en 1,0 mL de tampón) en 50 milunidades de  $\beta$ 1, 4GT, 5  $\mu$ mol de UDP – Gal, y 5  $\mu$ mol de MnCl<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas. Se añadió otra alícuota de la enzima y de UDP – Gal, y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37 °C. Las muestras de IgG regalactosiladas se purificaron utilizando una columna de proteína A HiTrap. Los oligosacáridos se liberaron por PNGase F y se caracterizaron por MALDI – TOF – MS y por HPLC tal y como se describe a continuación.

**[0099]** La glicofoma G2S2 se realizó produciendo muestras de IgG en 100 mM de tampón MES (pH 7,0) (~ 10 mg en 1,0 mL de tampón) utilizando columnas de NAP – 5 según el protocolo sugerido por el fabricante. A esta solución se añadieron 50 miliunidades de  $\beta$ 1, 4GT y  $\alpha$ 2, 3ST; 5  $\mu$ mol de UDP – Gal, CMP – Sia (isómero NANA), y MnCl<sub>2</sub>. La mezcla se incubó a 37 °C. Después de 24 horas, se añadió otra alícuota de enzimas junto a los azúcares de nucleótidos y la mezcla se incubó durante 24 horas adicionales a 37 °C. La glicofoma G2S2 de las muestras de IgG se purificó como se ha descrito anteriormente. Para un grupo de Ab1 G2S2 particular, Ab1 (G2S2 (ba), el ácido siálico que se unió inicialmente, se perdió posteriormente durante el almacenamiento, posiblemente debido a una contaminación de la sialidasa. Los análisis mostraron que solo el 30 % de los oligosacáridos Fc en Ab1 G2S2(ba) contenían ácido siálico, mientras que ~ 95 % de los oligosacáridos en Ab1 G2S2(al) contenían ácido siálico.

**[0100]** Las estructuras de glicanos de las preparaciones de Ab se analizaron mediante diversos métodos. Para realizar un análisis MALDI – TOF – MS de Abs de IgG intactas, se produjeron muestras de IgG en 10 mM de tampón Tris – HCl, pH 7,0 y se ajustó la concentración a ~ 1 mg / mL de tampón. Se mezcló 2  $\mu$ l de solución de IgG con 2  $\mu$ l de solución de matriz (la solución de matriz se preparó disolviendo 10 mg de ácido sinapínico en 1,0 ml de acetonitrilo al 50 % en agua que contienen 0,1 % de ácido trifluoroacético) y 2 ml de esta solución se cargaron en la diana y se dejaron secar al aire. Se adquirió MALDI – TOF – MS utilizando un instrumento Voyager DE de Applied BioSystems (Foster City, CA).

**[0101]** Para realizar un análisis MALDI – TOF – MS de liberación de glicanos Fc, las muestras de IgG (~ 50  $\mu$ g), antes y después de las reacciones de glicosilación *in vitro*, se digirieron con PNGase F en 10 mM de tampón Tris – HCl (50  $\mu$ g) pH 7,0 durante 4 horas a 37 °C. La digestión se detuvo acidificando la mezcla de reacción con ácido acético al 50 % (~ 5 $\mu$ l) y después se pasó a través de la columna de resina de intercambio catiónico tal y como se describió previamente (Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000). Estas muestras que contenían una mezcla de oligosacáridos ácidos y naturales se analizaron por MALDI – TOF – MS en el modo iónico positivo y negativo, tal y como se describe en otra parte de (Papac et al., 1996; Papac et al., 1998; Raju et al., 2000) utilizando un instrumento Voyager DE de Applied BioSystems (Foster City, CA).

**[0102]** Los análisis por HPLC de los glicanos Fc se realizaron digiriendo muestras de IgG (~ 50  $\mu$ g) en 10 mM de tampón Tris – HCl (~ 50  $\mu$ l) pH 7,0 con PNGase F a 37 °C durante 4 – 8 horas. La derivatización de oligosacáridos liberados con ácido antranílico (2 – ácido aminobenzoico) se llevó a cabo tal como se describe en (véase Anumula KR, Anal Biochem. 2000 Jul 15;283 (1):17 - 26). Brevemente, se preparó en primer lugar una solución del 4 % de acetato de sodio 3H<sub>2</sub>O (p / v) y 2 % de ácido bórico (p / v) en metanol. La derivatización del reactivo se preparó recientemente disolviendo ~ 30 mg de ácido antranílico (Aldrich) y ~ 20 mg de cianoborohidruro de sodio (Aldrich) en 1,0 ml de solución de metanol – sodio acetato - borato. Los oligosacáridos derivados de IgG (< 3 nmol en 20 – 50 $\mu$ l de agua) se mezclaron con 0,1 ml de solución del reactivo de ácido antranílico (AA) en 1,6 ml en los viales de congelación de tapón de rosca de polipropileno con anillos “O” (Sigma) y se tapan herméticamente. Los viales se calentaron a 80 °C en un bloque térmico o en un bloque de hornos (Reacti – Therm, Pierce) durante 1 – 2 horas. Después de enfriar los viales a temperatura ambiente, las muestras se diluyeron con agua para producir ~ 0,5 ml. Los oligosacáridos derivatizados se purificaron utilizando columnas de NAP – 5.

## **EJEMPLO 2: UNION A LOS RECEPTORES FC CELULARES DE BAJA AFINIDAD**

**[0103]** De los varios tipos de receptores Fc en las células efectoras, Fc<sub>gamma</sub> tipos II y III se consideran receptores de afinidad baja o intermedia. En general, la unión monomérica puede tener una afinidad demasiado baja para ser detectada o tener niveles muy bajos. Por ejemplo, la unión de IgG monomérica al Fc<sub>gamma</sub> tipo IIA es más difícil de medir. Estos receptores funcionan para unir compuestos inmunes, que debido a su naturaleza multivalente se unen con más avidez, presumiblemente debido a la constante lenta del compuesto.

**[0104]** Las células K562 humanas, que expresan Fc $\gamma$ RIIA como el único receptor Fc $\gamma$ , se utilizaron en dos tipos de ensayos de unión para probar si las variaciones en el contenido de ácido siálico en el glicano Fc afectan a la unión a este receptor Fc $\gamma$  humano de baja afinidad. Para obtener una avidez suficiente de unión a Fc $\gamma$ RIIA, que tiene una

baja afinidad para la IgG monomérica, los compuestos inmunes se prepararon mezclando Abs de prueba anti - FNT con FNT homotrimérico en una proporción molar 2:1, una proporción que se muestra para dar lugar solo a las cantidades residuales sin Ab o sin FNT. La dependencia de los compuestos inmunes se ilustró cuando el Ab2 radiomarcado solo se unió a las células K562 no detectables en las concentraciones de hasta 1 ug / ml pero los compuestos Ab2: FNT mostraron una unión significativa a 0,02 ug / ml (los datos no se muestran).

**Formato de unión de competición.** Se prepararon dos conjuntos de compuestos inmunes de IgG, un compuesto marcado que contenía el anticuerpo de IgG1 humana con especificidad irrelevante que se complejó a una región anti - V específica del Ab y Ab5 no humano. Para crear el compuesto marcado, se yodó un Ab monoclonal quimérico con regiones V de hámster con IgG1 humana y regiones constantes kappa de cadena ligera utilizando un reactivo IODO - GEN tal y como se ha descrito previamente (Knight et al., 1993). Un Ab monoclonal de IgG2a de rata específico para el idiotipo de la región V del híbrido hámster - humano se mezcló en una proporción molar 1:1 en TFS durante 30 minutos para permitir la formación de compuestos inmunes radiomarcados. La anti - Id de rata mostró que no contribuye a la unión de FcγRIIA directamente como cuando los compuestos se realizan con híbrido de hámster - humano desglucosilada, ocurrió una mínima; mientras que los compuestos con Ab quimérico no modificado mostraron altos niveles de unión (los datos no se muestran). Además, no hubo reactividad cruzada detectable entre los agentes utilizados para hacer los compuestos inmunes separados que podrían indicar que un compuesto inmune podría unirse a otro compuesto inmune (los datos no se muestran).

**[0105]** Para los compuestos de prueba, las variantes de ácido siálico de Ab1 se mezclaron con homotrimero de FNT humano en una proporción molar 2:1 (se muestra mediante el análisis de dispersión de luz que dio lugar a un Ab no unido muy pequeño más FNT no unido) en TFS a temperatura ambiente durante 30 minutos. En un conjunto de experimentos, los compuestos de las variantes naturales de Ab1 con el 20 y 29 % de ácido siálico se compararon entre sí. En un segundo conjunto de experimentos, el compuesto Ab1 - 29: FNT se comparó con el compuesto Ab1 - 43: FNT de la preparación mejorada de la columna de lectina. En los dos casos, el compuesto de control era Ab1 - Gno: FNT cuando se elimina enzimáticamente el anticuerpo de glicano.

**[0106]** Las células K562 humanas se sembraron  $3 \times 10^5$  células / pocillo en placas de 96 pocillos en IMDM, 5 % de SFB. Se añadió una cantidad fija del compuesto del anticuerpo radiomarcado para las diversas cantidades del complejo del anticuerpo de prueba y la mezcla combinada se añadió a las células K562 de manera que cada pocillo contenía una concentración final de 0,1 µg / ml de compuesto del anticuerpo yodado. Las placas se incubaron durante 16 - 18 horas a 4 °C, tras lo cual, el Ab no unido se eliminó lavándolo 3 veces con IMDM, 5 % de SFB, y el número de recuentos unidos a las células se determinó utilizando un contador gamma.

**[0107] Resultados.** Las cantidades aumentadas de los compuestos inmunes de los competidores no marcados inhibieron cada vez más la unión por el compuesto inmune radiomarcado. Las variantes de ácido siálico, Ab1 no modificado (sialilado al 29 %) y Ab1 MAAB (sialilado al 43 %) mostraron que el compuesto con el Ab más altamente sialilado se requirió en concentraciones 5 - 10 veces mayores que las del compuesto con el Ab1 menos sialilado para producir el mismo alcance de unión a FcγRII (Figura 4 A). Para las variantes naturales de Ab1 que difieren un 9 % del contenido de ácido siálico (20 contra 29), la diferencia tuvo una avidez 4 veces mayor para la preparación menos sialilada (no se muestra). Por lo tanto, la presencia de la forma isomérica NGNA del ácido siálico, como resultado de la expresión recombinante en una célula huésped de mieloma murina, en esta IgG1 humana se redujo la avidez de los compuestos inmunes para FcγRII humano.

**[0108] Unión de los compuestos inmunes a las células K562.** Las muestras de ensayo de Ab1 se mezclaron con FNT humano marcado en  $I^{125}$  en una proporción molar 2:1 fijada, y a continuación las diversas cantidades del compuesto inmune resultante se añadieron a  $3 \times 10^5$  de células K652 en una placa de cultivo de 96 pocillos. Una comparación de los compuestos de Ab1 G2: FNT (Ab no sialilado) contra los compuestos Ab1 G2S2 (al): FNT (Ab sialilado por completo) mostró que el Ab sialilado por completo se unió con mucha menos avidez, con la variante altamente sialilada que era necesaria en concentraciones 10 veces más altas que la variante asialilada para alcanzar el mismo grado de unión (Figura 4 B). Estos resultados indican que la presencia del isómero NANA de ácido siálico, introducido por modificaciones enzimáticas *in vitro*, redujo la avidez del anticuerpo para FcγRII humano que podría atribuirse a la reducción en la afinidad de unión de la diana (FNT), provocando de este modo que los compuestos Ab: FNT sean menos estables mediante la reducción de la afinidad de la región constante para el receptor Fc o ambos.

**Unión de Ab a FcγRIIIa celular.** Para analizar la unión de Ab a FcγRIIIa en células asesinas naturales (NK), las CMSPs humanas se aislaron tal y como se describió anteriormente, y las células NK se aislaron de las CMSPs por clasificación celular magnética utilizando el kit de Aislamiento de Células NK (Miltenyi Biotec). Las células NK se cultivaron durante la noche en placas de 96 pocillos en  $1 \times 10^5$  células por pocillo en medio DMEM con 10 % de SFB a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. El mAb 3G8<sup>22</sup> anti FcγRIIIa (BD Biosciences Pharmingen) se marcó con  $I^{125}$  utilizando tubos de Iodogen (Pierce) para una actividad específica de 11 µCi / µg. El mAb 3G8 yodado se premezcló con diversas cantidades del Ab competidor no marcado en DMEM, 10 % de SFB y la mezcla de Ab se añadió a las células NK para una concentración final de 0,3 µg / ml de 3G8 yodado. Las células se incubaron a 4 °C durante 16 horas y luego la IgG no unida se eliminó lavándola 4 veces con TFS. El número de CPMs unidas a las células se determinó utilizando un contador gamma.

- 5 [0109] Las células U – 937 (sin pretratar para mejorar la expresión FcγR) que habían sido cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 2 nM de L – glutamina, 1 nM de piruvato de sodio y 10 % de SFB (medio de U – 937) se sembraron en placas de 96 pocillos que tienen 3 x 10<sup>5</sup> células por pocillo en 50 μl de medio de U – 937. El Ab2 (IgG1 humana) se marcó con I<sup>125</sup> para una actividad específica de 17 μCi / μg. El Ab de Ab2 yodado se premezcló con diversas cantidades de muestras de Ab2 competidor no marcado en medio U – 937. Se añadieron después 50 μl de mezcla de Ab a 50 μl de células U – 937 para tener una concentración final de 0,2 μg / ml de Ab3 yodado en todos los pocillos. Las células se incubaron a 4 °C durante 16 horas y el Ab no modificado se eliminó lavándolo tres veces con medio U – 937. El número de CPMs unidas a las células se determinó utilizando un contador gamma.
- 10 [0110] Para probar si las variantes de Ab mostraron una afinidad diferencial para FcγRIIIa, las células NK aisladas recientemente se aislaron de los donantes humanos sanos y se utilizaron en experimentos de unión de competición involucran mAb 3G8 radiomarcado, un Ab anti - FcγRIIIa compete por la unión con Fc, y Abs no marcados como competidores. Los Abs libres no complejados se utilizaron en lugar de los compuestos inmunes (normalmente muestran una unión mucho mayor a FcγRIIIa) de manera que los resultados no se confundirían por las diferencias en la estabilidad de los propios compuestos inmunes solubles, que pueden ser influenciados por el contenido de ácido siálico de Fc (no se publican nuestros datos). Los resultados mostraron que la variante natural más sialilada de Ab1, Ab1 – 29, tuvo una afinidad reducida para FcγRIIIa en las células NK, requiriéndose concentraciones 4 veces mayores a las de Ab1 – 20 para alcanzar el mismo grado de unión (Figura 5 A). Hubo una diferencia similar con las variantes naturales de Ab5, donde Ab5 – 26 requería concentraciones 5 veces mayores a las de Ab5 – 0 para competir contra mAb 3G8 para el mismo alcance (Figura 5 B). Se obtuvieron resultados similares en cada experimento cuando se utilizaron las células NK de al menos otros dos donantes de sangre (los datos no se muestran; no se determinó el alotipo de FcγRIIIa). Estos resultados mostraron que los niveles más elevados de sialilación pueden reducir la afinidad de la IgG para FcγRIIIa y, por lo tanto, es casi seguro que se contribuyó a la reducción observada en la actividad ADCC.
- 25 [0111] Cuando se realizó el mismo experimento con los pares de variantes derivados por el fraccionamiento de lectina, no obstante, se observó que las variantes más sialiladas se unieron a FcγRIIIa tan bien y, quizás ligeramente mejor, que las variantes menos sialiladas (Figuras 5 C y 5 D). No se conocen los motivos de los diferentes resultados con los dos pares de variantes naturales y los dos pares de variantes derivadas de lectina, aunque una buena posibilidad es que existen diferencias en las ubicaciones de los residuos de ácido siálico presentes.

### EJEMPLO 3: ENSAYOS ADCC *IN VITRO*

- 35 [0112] Las células diana para el Ab anti - FNT comprendió una línea celular de mieloma de ratón Sp2 / 0 que se expresa de forma estable de FNT humano recombinante superficial que permanece en una forma de transmembrana debido a la introducción de una delección de 1 – 12 aminoácidos de FNT maduro (Perez et al., 1990). Las células K2 se cultivaron en medio de Iscove que contiene SFB inactivado por calor, 2 mM de L – glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, y MHX. Los medios de cultivo y los suplementos se adquirieron en Gibco (Invitrogen). Las células se subcultivaron a 1:5 cada 2 – 3 días. En el día del ensayo, las células K2 se centrifugaron y se lavaron una vez con TFS. Las células se ajustaron a 1 x 10<sup>6</sup> células / ml con el medio de cultivo y 15 microlitros de reactivo de marcaje fluorescente (en el Kit de Reagente de Citotoxicidad Delfia EuTDA, Perkin – Elmer Life Sciences) se añadieron a 5 ml de células (Blomberg et al., 1996). Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, luego se lavaron dos veces con TFS a 1000 rpm, 5 minutos. Inmediatamente antes de la mezcla con células efectoras de CMSPs, las células diana se centrifugaron y se volvieron a suspender en 2 x 10<sup>5</sup> células / ml en medio de Iscove que contiene 1 % de SFT.
- 45 [0113] Las células efectoras de CMSPs se aislaron de los donantes sanos tras la recogida de sangre en tubos de vacutainer heparinizados, y se diluyeron dos veces con TFS. Treinta ml de sangre diluida se depositaron en la parte superior de 15 ml de Ficoll – Paque (Amersham, Uppsala, Suecia) en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 1500 rpm, 30 minutos a temperatura ambiente (TA). La interfaz (capa leucocitaria) que contenía CMSPs se recogió y se lavó dos veces con TFS y se centrifugó a 1200 rpm, 10 minutos a TA. Las células se volvieron a suspender en medio de Iscove que contenía 5 % de SFB inactivado por calor, 2 mM de L – glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales. Las CMSPs se activaron durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> mediante la incubación de 100 mm de placas de cultivo tisular (Corning) que se habían cubierto con OKT3 (10 ug / ml en TFS, Ortho Pharmaceutical) durante la noche a 4 °C y se enjuagó con TFS. Las CMSPs se recogieron, se lavaron una vez con medio de Iscove que contenía 1 % de SFT, se contaron y se volvieron a suspender en 1 x 10<sup>7</sup> células / ml.
- 50 [0114] Las muestras de prueba de Ab1, incluyendo el Ab1 Gno de la variante de control negativo, se diluyeron en serie en 1 % de medio de SFB de Iscove. Cincuenta microlitros de células diana (~ 10.000) y 100 microlitros de anticuerpo se añadieron a una placa de 96 pocillos con fondo redondo (Corning). Cincuenta (50) microlitros de células efectoras (- 500.000 células) se añadieron a la mezcla, y la placa se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a TA. La proporción de E: T fue normalmente de 50:1, sin embargo, algunas veces se utilizó 35:1. Para la fluorescencia de fondo, los pocillos se incubaron con células efectoras, células diana y medios. Para una fluorescencia máxima se añadieron 10 microlitros de solución de lisis (del Kit de Citotoxicidad Delfia EuTDA) a los pocillos de fondo. Para el análisis ADCC, las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Se transfirieron 20 microlitros de sobrenadante a una placa de 96 pocillos con fondo plano (Corning). Se añadieron 200

microlitros de solución de Europio (del Kit de Citotoxicidad Delfia EuTDA) y la placa se colocó en un agitador de placas durante 10 minutos a TA. La fluorescencia se midió en un fluorómetro a tiempo resuelto, EnVision Instrument (Perkin-Elmer Life Sciences). El porcentaje de lisis específica en cada muestra se calculó según la siguiente fórmula:  
 % de liberación específica =  $\frac{[\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}]}{[\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}]} \times 100$ .

**[0115]** Las evaluaciones iniciales de los efectos del ácido siálico se centraron en la actividad ADCC *in vitro* de dos pares de variantes naturales. Ab1 – 29 y Ab1 – 20 se incubaron en diversas concentraciones con células diana que expresan Ag1 marcado con Europio. Como muestra la Figura 6 A, hubo una clara diferencia en la actividad citotóxica, en la que el Ab1 – 29, con niveles más altos de sialilación Fc, requirió concentraciones 7 veces mayores que las del Ab1 – 20 a fin de desencadenar la lisis celular en igual medida. Los resultados mostraron que el subgrupo de Ab1 se enriqueció en las glicofomas sialiladas, Ab1 MAAB, fue menos potente que el TFS de Ab1 no modificado. Se necesitaron 3 veces más del material de Ab1 MAAB 43 % para alcanzar la misma cantidad de lisis como la muestra del 29 % en TFS de Ab1. Los experimentos con células diana que expresan Ag5 mostraron el mismo patrón para el par de variantes naturales de Ab2. Para lograr el mismo nivel de lisis celular como la variante Ab2 – 0 con ácido siálico no detectable, se requirió una concentración 6 veces mayor de Ab2 – 26 (tal y como muestra la Figura 6 B). Por lo tanto, el efecto de la variación de la glicosilación natural en esta medida de ADCC no es Ab o diana específica.

**[0116]** En un experimento representativo para comparar la actividad ADCC de los subgrupos del Ab1 que difieren en su contenido de ácido siálico después de un fraccionamiento basado en lectina, el Ab1 MAAB (sialilado al 43 %) se comparó con el grupo de Ab1 no modificado del que se deriva (TFS de Ab1). En un segundo experimento para comparar los grupos de Ab1 que difieren en el contenido de ácido siálico, se compararon entre sí el Ab1 WGAT (sialilado al 29 %), Ab1 WGAR (sialilado al 40 %), y Ab1 WGAB (sialilado al 32 %).

**[0117]** Los resultados del ensayo también demostraron una relación inversa entre el contenido de ácido siálico y la potencia en el ensayo ADCC independientemente de la forma en la que se prepara el Ab (Figura 6 C). Es decir, el Ab1 WGAT, que contiene la misma cantidad de ácido siálico que el Ab1 no modificado, mostró la misma actividad que el Ab1 no modificado. Sin embargo, WGA preparó fracciones que pierden potencia con el incremento del contenido de ácido siálico (Figura 6 C).

**[0118]** En un experimento, se compararon dos muestras con diferencias más profundas en el contenido de ácido siálico, Ab1 G2 modificado enzimáticamente (sialilado al 0 %) y Ab1 G2S2 (al) (~ 95 % sialilado). Las CMSPs frescas se aislaron por densidad de centrifugación en Ficoll – Paque. Se preincubaron  $5 \times 10^5$  CMSPs en un volumen de 100 ml durante 10 minutos con diversas cantidades de Ab1, Ab1 G2S2 (al) no tratados (galactosilado y sialilado por completo), o Ab7, Ab de control negativo que coincide en el isótopo. Las células K2 que expresan FNT humano recombinante de unión superficial se utilizaron como dianas mediante marcaje con 200 mCi de Cr<sup>51</sup>. Las células marcadas se añadieron a la mezcla CMSP/ Ab, se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto, y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se sabe que este periodo de incubación (4 horas) revela principalmente la lisis celular inducida por las células NK (en la población de células de CMSPs), que expresan FcγRIIIA, en lugar de macrófagos, que en general expresan FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), y FcγRIIIA (CD16A). El número de radioactividad en los sobrenadantes celulares se determinó entonces utilizando Topcount. Los resultados mostrados (Figura 6 D) son representativos de dos experimentos independientes realizados utilizando CMSPs de donantes diferentes y muestran un cambio de potencia de más de 10 veces de la lisis celular entre Ab sialilado por completo y uno que está casi desialilado.

**[0119]** Otros pares de preparaciones de Ab se compararon también en el ensayo ADCC. Las fracciones de lectina WGA preparadas a partir de AB2 galactosilado se evaluaron en ensayos ADCC utilizando células diana que expresan Ag2. Una vez más, el material más alto sialilado fue menos activo, aunque hubo una diferencia de 4 veces en sus valores EC<sub>50</sub> a pesar de su gran diferencia en el contenido de ácido siálico (5 % contra 67 %). Por comparación, las fracciones de lectina WGA realizadas a partir de Ab1 mostraron que la variante sialilada al 41 % requería concentraciones 6 veces mayores que la variante sialilada al 29 % para alcanzar el mismo grado de lisis celular.

**[0120]** Los resultados para estos tres Abs probados mostraron consistentemente que los niveles más altos de ácido siálico de Fc se asociaron con la actividad ADCC reducida. Aunque no es cuantitativo, las diferencias entre el cambio de magnitud en la actividad ADCC y el contenido de ácido siálico de las preparaciones de Ab, hubo una relación consistente en el panel de las cuatro variantes de Ab1, donde los valores EC<sub>50</sub> eran normalmente 0,3 ng / ml, 2 ng / ml, 2 ng / ml y 10 ng / ml para Ab1-20, Ab1-29, Ab1 – WGA - 29, y Ab1 – WGA - 41, respectivamente. Los resultados con las fracciones de lectina también confirmaron que las preparaciones de Ab sialiladas contienen especies moleculares con diversos niveles de actividad ADCC. Cabe señalar que, a excepción de Ab3 – 0 y Ab3 – 26, las variantes analizadas en la presente tienden a no mostrar diferencias en el nivel máximo de lisis lograda.

**[0121]** Dado que este método de medición de actividad ADCC está mediada principalmente por las células NK positivas de FcγRIIIA, los datos implican que, mientras la presencia de ácido siálico de los oligosacáridos Fc mejora la unión a FcγRI, su presencia disminuye significativamente la unión a FcγRIIIA.

**EJEMPLO 4: UNIÓN AL RECEPTOR FC CELULAR DE ALTA AFINIDAD**

**[0122]** La unión de los Abs de prueba que diferían en el contenido de ácido siálico para el receptor Fc humano de alta afinidad, FcγRI (CD64), se midió utilizando un formato de unión de competición en una línea celular monocítica humana, las células U – 937. Las células U – 937 se cultivaron en medio RPMI 1640 con 2 mM de L – glutamina, 1nM de piruvato de sodio, y 10 % de SFB en matraces en T, y se mantuvieron en una incubadora con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. El Ab2, un Ab quimérico de IgG1 de ratón / humano, se yodó utilizando tubos de yodo precubiertos de IODO – Gen para una actividad específica de 17,2 mCi / mg. Las células U – 937 se volvieron a suspender en 6 x 10<sup>6</sup> células / ml con medio de cultivo fresco, y después se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos Milipore con filtros con una densidad de 3 x 10<sup>5</sup> células por pocillo. Las células no se pretrataron para inducir una expresión FcγR más alta. El Ab2 yodado se premezcló con diversas cantidades del competidor de Mab no marcado (las muestras de la prueba) utilizando medio de cultivo como diluyente, en un volumen de 50 μl. Las mezclas se añadieron a 50 μl de cultivo de células U – 937 para proporcionar una concentración de Ab2 yodada final de 0,2 ng / ml. Las células se incubaron a 4 °C durante 16 horas. La IgG no unida se eliminó lavándola con medio y aspirándola tres veces utilizando un sistema de vacío de placas. El número de recuentos unido a las células se determinó utilizando un contador gamma.

**[0123]** La Figura 7 A muestra que, en comparación con el Ab1 G2 (sin ácido siálico), el Ab1 G2S2 (al) (~ 95 % sialilado) se unió al FcR de alta afinidad (CD64) en las células U – 937 con una afinidad 5 a 10 veces más alta, es decir, se necesitó solo de una quinta parte a una décima parte de la concentración Ab1 G2S2(al) para proporcionar el mismo grado de inhibición de unión de Ab2 yodado. El Ab1 G2 no mostró diferencias detectables de Ab1 no tratado (los datos no se muestran), siendo este último una mezcla heterogénea de glicofomas diferentes, la mayoría de las cuales contienen menos galactosa (es decir, glicofomas G0 y G1) que la muestra de Ab1 G2.

**[0124]** la Figura 7 B muestra que dos grupos diferentes de Ab3 difieren en la cantidad de especies oligosacáridas cargadas (especies que contienen ácido siálico), siendo bien el 2 % del total de oligosacáridos o el 42 %, de manera similar muestran que el grupo caracterizado por tener un contenido más alto de ácido siálico tiene una afinidad más alta para FcγRI.

**[0125]** Tras observar la unión reducida a FcγRIIIa de la células NK por las preparaciones de anticuerpos con un contenido de ácido siálico más alto para los dos pares de variantes de glicosilación natural de Ab1 y Ab5 (Ejemplo 3, Figuras 5 A y B), se consideró la posibilidad de que el efecto se deba a la simple repulsión electrostática entre el ácido siálico cargado negativamente y la superficie celular cargada negativamente. Sin embargo, el efecto inverso del contenido de ácido siálico en la afinidad de unión para el receptor FcγRI en las células U – 937 humanas no siguió el mismo patrón para Ab5 u otros Abs (los datos no se muestran).

**[0126]** Cabe señalar que, mientras que las dos muestras de Ab1 difieren en la ausencia / presencia de la forma NANA del ácido siálico, se cree que las dos muestras de Ab3 difieren en la cantidad de la forma NGNA del ácido siálico (producido en las células huésped de ratón).

**EJEMPLO 5: MEDICIÓN DE LA SEMIVIDA DEL SUERO**

**[0127]** En el presente ejemplo, una proteína de fusión que contiene Fc comprende un péptido N - terminal fusionado en una secuencia de región variable de un anticuerpo y una bisagra de IgG1 humana, dominios CH2 y CH3 expresados en células de mieloma de ratón tratados para formar una forma sialilada completa (G2S2). A las ratas CD1 hembra normales (4 por grupo de tratamiento) se les administró por inyección intravenosa cualquiera de las formas no modificadas de FcP1, que contenían oligosacáridos Fc sialilados al 5 %, o la versión sialilada completa (~ 98 % sialilada) se inyectaron por vía intravenosa por separado a grupos de ratas CD1hembra. La sangre se recogió por sangrado retro - orbital a la hora, 5 horas, 24 horas, 72 horas, 7 días, 14 días y 21 días, y luego la colección de sangre terminal se tomó mediante punción cardíaca de los animales anestesiados con CO<sub>2</sub> en el día 28. El suero se preparó a partir de muestras de sangre y la concentración de Fc humano en el suero se midió utilizando un colorímetro ELISA. Brevemente, las placas EIA de 96 pocillos se cubrieron en primer lugar con anticuerpos Fc policlonales de cabra antihumanos. Las diversas disoluciones de las muestras de suero se incubaron en los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína no unida se eliminó lavándola, y se unió al Fc humano detectado utilizando anticuerpos de cabra anti - IgG humanas conjugadas con enzimas, seguido por los sustratos de color apropiados.

**[0128]** Los resultados del estudio se muestran en la Figura 8. El área bajo la curva (AUC) calculada fue 95 ± 1,6 día · ng / ml X 10<sup>-3</sup> para el anticuerpo no modificado y 48 ± 1,9 días · g / ml X 10<sup>-3</sup>. Esto muestra que un grado más alto de sialilación en el oligosacárido Fc se asoció con una velocidad más rápida en la depuración de las ratas normales.

**[0129]** En un segundo experimento, a los ratones normales se les inyectó una dosis única de 3 mg / kg de Ab2 enzimáticamente modificado para asialilarse por completo (G2) o sialilarse por completo (G2S2). El Fc humano en el suero se controló y se midió utilizando el colorimétrico ELISA tal y como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este experimento se mostraron en la Figura 9. Tras una semana, el Ab2 G2S2 comenzó a depurarse más rápido

a partir del suero de los ratones y durante 20 días el Ab2 G2S2 restante en el suero fue 1000 veces menor que la concentración del Ab2 – G2.

5 Depuración de las variantes de ácido siálico de Ab1 del la circulación sistémica en ratones. Se realizó otra medición directa del efecto del contenido de ácido siálico cuantificando la velocidad de depuración de las especies de glicosilación individuales del suero tras la inyección de una muestra que contiene una mezcla heterogénea de especies glicanas unidas a un Ab1.

10 **[0130]** La misma preparación heterogéneamente glicosilada de Ab1 se inyectó por vía intravenosa a 18 ratones normales Balb / c de entre 8 – 10 semanas una dosis de 20 mg / kg. Se recogió la sangre de 6 ratones en el día 3, a otros 6 ratones en el día 14, y a los 6 ratones restantes en el día 28. Se preparó el suero de cada muestra de sangre y el Ab1 se volvió a purificar a partir del suero utilizando una columna de afinidad anti - Id específica para las regiones V de Ab1. Las estructuras de los glicanos Fc de las muestras de Ab1 que se volvieron a purificar se analizaron mediante el análisis por HPLC y la proporción relativa de las diversas glicofomas se determinó tal y como se ha descrito anteriormente en la presente.

15 **[0131]** Se descubrió que la glicofoma galactosilada que carece de ácido siálico (G2S0) mantiene su abundancia relativa durante 4 semanas en los ratones, mientras que las glicofomas de Ab que contienen glicanos con ácido siálico 1 (G2S 1) y las glicofomas con ácido siálico 2 (G2S2) se depuraron a una velocidad más rápida. Por lo tanto, las proteínas que contienen Fc sialiladas por completo tienen una semivida del suero más corta que las composiciones asialiladas o parcialmente sialiladas.

#### **EJEMPLO 6: CONTENIDO DE ÁCIDO SIÁLICO Y AVIDEZ DEL ANTICUERPO**

25 **[0132]** Los resultados descritos en el presente documento respaldan la teoría de que un cambio en el contenido de ácido siálico del glicano Fc del dominio Fc (bisagra dimerizada CH2 – CH3) tendrá un impacto en la proteína. Con respecto a la bivalencia de los anticuerpos y las proteínas de fusión que comprenden un Fc glicosilado, los efectos pueden manifestarse en la avidéz de la proteína para una diana específica. Para probar esta teoría se realizaron los experimentos en este ejemplo y, además, se demuestra el efecto específico del contenido de ácido siálico en la afinidad de unión de la diana.

30 Unión a la superficie celular del antígeno. Las mismas líneas celulares que expresan Ag utilizadas en los ensayos ADCC descritos con anterioridad se utilizaron en los ensayos de unión para probar las diferencias entre las variantes de ácido siálico en su avidéz de unión al antígeno. Los ensayos se realizaron en un formato de competición, en el que uno de los Abs radiomarcados (Ab1, Ab2 o Ab5), permanece en una concentración fija, se incubó con las células que expresan Ag en presencia de diversas cantidades de Abs de prueba no marcados. Los Abs yodados, preparados por el método lodogen, tenían en general una actividad específica de 10 uCi / ug.

35 **[0133]** Las células que expresan FNT superficiales se sembró en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 50.000 células por pocillo, y las células que expresan Ag2 con 180.000 células por pocillo, en medio IMDM con 5 % de SFB. El Ab marcado en I<sup>125</sup> apropiado se premezcló con cantidades de titulaciones de Abs de prueba y la mezcla se añadió a las células que expresan Ag adecuado. Las placas se incubaron a TA durante 2 horas para permitir la unión de Ab a las células. Las células se lavaron después tres veces con IMDM, 5 % de SFB para eliminar el Ab no unido, y el número de recuentos unidos a las células se determinó utilizando un contador gamma.

40 **[0134]** Para las variantes de Ab5, las células que expresan Ag5 se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 186.000 células por pocillo en 50 µl de DMEM, 10 % de SFB. El Ab marcado en I<sup>125</sup> se premezcló con cantidades de titulaciones de Abs de prueba y se añadieron 50 µl de mezcla a las células que expresan Ag. Las placas se incubaron a 4 °C durante 16 horas para permitir la unión de Ab al antígeno en las células. Las células se lavaron después tres veces con IMDM, 10 % de SFB para eliminar el Ab no unido, y el número de recuentos unidos a las células se determinó utilizando un contador gamma. Las muestras se probaron en duplicados o cuadruplicados, y los resultados mostraron que son representativos de 3 o 4 experimentos independientes. La diferencia en la unión entre estas muestras de prueba fue significativa (P < 0,0001 para los gráficos a, c y d) tal y como se determinó por la prueba F de la suma extra de cuadrados.

45 **[0135]** Los resultados se muestran en las Figuras 10 A – D: unión por Ab1 radiomarcado en las células que expresan Ag1 en presencia de las variantes naturales de Ab1 no marcado como competidores (Figura 10 A); unión por Ab5 radiomarcado en las células que expresan Ag5 en presencia de las variantes naturales de Ab5 no marcado como competidores (Figura 10 B); unión por Ab1 radiomarcado en las células que expresan Ag1 en presencia de las variantes derivadas de lectina de Ab1 no marcado como competidores (Figura 10 C); unión por Ab3 radiomarcado en las células que expresan Ag3 en presencia de las variantes derivadas de lectina de Ab3 no marcado como competidores (Figura 10 D).

50 Unión de Ab a un ligando en fase sólida. El FNT soluble recombinante o la anti – Id2 se recubrieron con placas EIA añadiendo 50 µl de Ag o Ab anti – Id en 1 µg / ml en TFS a cada pocillo y se incubaron las placas a 4 °C durante la noche. Los pocillos se lavaron y se pretrataron después con 50 µl de 1 % de SFT, 0,125 % de gelatina en TFS durante 1 hora a TA para minimizar la unión no específica. El Ab1 marcado en I<sup>125</sup> o el Ab3 marcado en I<sup>125</sup> se

65



premezcló con cantidades de titulaciones de las respectivas preparaciones de Ab de prueba en IMDM, 5 % de SFB, y 50 µl de la mezcla se añadieron a los pocillos cubiertos diana. La concentración final de Ab radiomarcado fue de 100 ng / ml en todos los pocillos. Las placas se incubaron a TA durante 2 horas para permitir la unión de Ab a las dianas cubiertas. Los pocillos se llevaron para eliminar el Ab no unido y el número de recuentos unidos se determinó utilizando un contador gamma.

**Unión de Abs de las placas cubiertas en el antígeno soluble.** Se cubrieron placas de 96 pocillos con las variantes de ácido siálico de Ab1 o Ab3 y después se incubaron con diversas cantidades de antígeno soluble radiomarcado como se indica a continuación: (a) unión de Ag1 soluble radiomarcado en las variantes naturales de Ab1 de las placas cubiertas, (b) unión de Ag1 soluble radiomarcado en las variantes fraccionadas de lectina de Ab1 de las placas cubiertas, y (c) unión de Ag3 soluble radiomarcado en las variantes fraccionadas de lectina de Ab3 de las placas cubiertas. Las incubaciones paralelas con Ag radiomarcado y los excesos de 100 veces de Ag no marcado se realizaron para determinar la unión no específica. Las muestras se probaron en triplicados. Las variantes de Ab2 no se analizaron debido a la falta de disponibilidad de Ag2 soluble.

**Análisis estadístico.** Se analizó una diferencia de potencia entre las variantes del anticuerpo mediante la comparación de las curvas utilizando regresiones logísticas simultáneas de los 4 parámetros con un mínimo y máximo común, y una pendiente seguida por una prueba preliminar para la pendiente y el alcance dando una meseta común para una concentración cero (es decir, siempre suponiendo sin probar una "parte inferior" común para el aumento de las curvas y una parte superior común para la disminución de las curvas). La importancia de la prueba se realizó con la prueba F de la suma extra de cuadrados en GraphPad Prism v4. Se consideró como significativo un valor P de < 0,05. Los análisis en CPM se ponderaron de forma inversa por  $CPM^2$  puesto que la desviación estándar del CPM aumenta proporcionalmente en su media (es decir, el coeficiente del CPM de la variación, CV no está relacionada con la media).

**Resultados.** Los experimentos de unión al antígeno realizados en un formato de competición con las mismas células diana que expresan Ag que se utilizaron en los ensayos ADCC mostraron de manera inesperada al Ab1 – 29 para unir consistentemente el antígeno de la superficie celular con una afinidad 3 veces menor a la del Ab1 – 20 (Figura 10 A). El Ab5 – 26, por el contrario, mostró una afinidad indistinguible de Ab5 – 0 (Figura 10 B). Los mismos análisis que se realizaron con los dos pares de variantes derivadas de lectina mostraron resultados similares en las variantes naturales de Ab1, es decir, Ab1 – WGA – 41 sialilado más alto requirió concentraciones de 4 – 6 más altas que la Ab1 – WGA – 29 menos sialilada para alcanzar el mismo grado de unión competitiva (Figura 10 C), y el Ab2 – GT – WGA – 67 sialilado más alto requirió concentraciones de 4 a 6 más altas que el Ab2 – GT – WGA – 5 menos sialilado (Figura 10 D).

**[0137]** Curiosamente, se observó también el mismo patrón de unión disminuida por las variantes de Ab1 y Ab2 con cantidades más altas de sialilación en los experimentos de análisis de unión a las dianas (antígeno recombinante soluble o Ab anti – Id) que se inmovilizaron en placas EIA de 96 pocillos (Figura 11 A y B). Estos resultados mostraron que las diferencias en el alcance de la sialilación Fc pueden tener un impacto en la unión al antígeno así como a FcγRIIIA, aunque el alcance de sialilación no afecta a la unión del antígeno de todos los Abs.

**[0138]** A partir de los datos de la unión de la diana inmovilizada, se cree que el aumento de la sialilación Fc puede ser útil para reducir la flexibilidad de la región de la bisagra de Ab. En el caso de antígenos Ab1 y Ab2 de unión a la superficie celular, la flexibilidad de la bisagra reducida podría dar lugar a más uniones monovalentes y menos bivalentes (avidez elevada) de la unión al antígeno en función de la separación de los epítomos de antígeno en el soporte sólido o superficie celular. La región de la bisagra de Ab5 puede además tener flexibilidad reducida, pero la flexibilidad no es necesaria para que este Ab alcance la unión máxima en Ag5.

**[0139]** A fin de diferenciar si los efectos de flexibilidad de Ab o los cambios de afinidad de unión intrínseca se vieron afectados por la sialilación Fc, la unión de Ab en el ligando soluble se probó como medida de afinidad de unión monovalente. Los resultados mostraron de hecho que para los tres pares de variantes de ácido siálico que mostraban diferencias en la unión al antígeno de superficie celular, no se observaron diferencias detectables entre los pares de las variantes en su unión a dianas solubles (Figuras 12 A – C). Como conjunto, estos resultados demostraron que las diferencias en la unión a las dianas inmovilizadas (superficie celular o placa cubierta) no se debían a diferencias en la afinidad intrínseca entre cada brazo Fab y la diana. Por lo tanto, las diferencias entre las variantes de ácido siálico de Ab1 y Ab2 en su unión a las dianas inmovilizadas se deben a las diferencias en el alcance de la unión bivalente a las células.

## EJEMPLO 7: PREPARACIÓN DE UN VECTOR PARA LA SECRECIÓN DE SIALIDASA

**[0140]** *Conjunto de plásmidos de la expresión de sialidasa.* Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio catalítico de la sialidasa *Arthrobacter ureafaciens*, residuos 40 a 535 del número de acceso de GenBank AY934539, se sintetizó basada en esta secuencia. El gen sintetizado (SEC ID N° 2) que codifica la fusión del dominio catalítico de la secuencia señal de la hormona de crecimiento humana de *Arthrobacter ureafaciens* (SEC ID N° 1 con la secuencia de señal como los primeros 26 aminoácidos y el dominio catalítico de los 494 aminoácidos restantes) se clonó en un plásmido p2815 utilizando sitios de restricción únicos BamH I y Not I. Este plásmido posee un promotor CMV, una secuencia de codificación para la secuencia de señal de la hormona del crecimiento humano que afecta a la secreción, y un gen de resistencia a la neomicina para la selección estable. La secuencia de

codificación para el dominio catalítico de la enzima ligada a la secuencia de codificación de señal de la HCH (SEC ID N° 1) se comprobó por la digestión de enzimas de restricción y la secuenciación.

- 5 **[0141]** *Transfección transitoria y estable.* Para la transfección transitoria, las células HEK293 se transfectaron con 15 ug de plásmido p3629 purificado o con el plásmido del control (vector vacío) utilizando Lipofectamine 2000. Se diluyeron el ADN del plásmido y 90 ul de Lipofectamine 2000 en Optimen, se combinaron, y después se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El cóctel de transfección se añadió a continuación al 70 % de las células HEK293 confluentes en el medio de cultivo durante la noche. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó con medio 293SFM, y las células se incubaron durante 5 días para la recogida del medio y análisis. Para la transfección estable, las células C168M se electroporaron con 10 ug de p3629 que había sido linearizado por la digestión de restricción con Bg1 II. Las células transfectadas se mantuvieron en el medio de cultivo con 700 ug / mL de antibiótico Geneticina para seleccionar los transfectantes estables. Los clones resistentes al antibiótico se expandieron, y se analizó la sialidasa.
- 10
- 15 **[0142]** *Ensayo de la actividad de la sialidasa.* La actividad de la sialidasa se analizó utilizando 2' - (4 - metilumbeliferil) - a - D - N - ácido acetilneuramínico. Se realizó un ensayo fluorométrico en el sobrenadante celular de los cultivos celulares viables mezclándolos con 200 uL de 150 uM 2' - (4 - metilumbeliferil) - a - D - N - ácido acetilneuramínico en 100 mM de tampón citrato - fosfato, pH 6,5 a 37 °C, seguido por la adición de 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M para detener la reacción. La excitación se realizó a 366 nm y la emisión a 446 nm. Las unidades fluorométricas se normalizaron contra los recuentos celulares viables. Alternativamente, la actividad de la sialidasa en el medio de cultivo se determinó mediante la incubación durante la noche de Remicade sialilado con medio de las células transfectadas, y el análisis del ácido siálico tal y como se describe a continuación.
- 20
- 25 **[0143]** *Determinación del ácido siálico.* La actividad de la sialidasa se determinó analizando la eliminación del ácido siálico del anticuerpo purificado tras la incubación con los sobrenadantes del cultivo celular. Los oligosacáridos N -ligados se liberaron por el tratamiento de las muestras de IgG (0,05 - 0,5 mg en 0,1 ml) con PNGase F en 20 mM de tampón Tris - HCl, pH 7,0 a 37 °C durante 4 - 6 horas. Una alícuota de esta solución (~ 0,01 ml) se pasó a través de una columna que contenía una resina de intercambio catiónico y se analizó por MALDI - TOF - MS tal y como se describió previamente. La parte restante de la muestra se sometió a una aminación reductora con ácido antranílico y posterior análisis por HPLC tal y como se describe en Anumula. Brevemente, se preparó en primer lugar una solución de acetato de sodio - 3H<sub>2</sub>O al 4 % (p / v) y 2 % de ácido bórico (p / v) en metanol. El reactivo de derivatización se preparó fresco disolviendo ~ 30 mg de ácido antranílico (Aldrich) y ~ 20 mg de cianoborohidruro de sodio (Aldrich) en 1,0 ml de solución de metanol - acetato - borato de sodio. Los oligosacáridos derivados de IgG (< 3 nmol en 20 - 50 µl de agua) se mezclaron con 0,1 ml de solución de reactivo de ácido antranílico (AA) en 1,6 ml de viales de congelación de tapón de rosca de polipropileno con anillos "O" (Sigma) y se tapan herméticamente. Los viales se calentaron a 80 °C en un bloque térmico (Reacti - Therm, Pierce) durante ~ 1 hora. Después de enfriar los viales a temperatura ambiente, las muestras se diluyeron con agua para producir un volumen de ~ 0,5 ml. Los oligosacáridos derivatizados se purificaron tal y como se ha descrito con anterioridad.
- 30
- 35
- 40 **[0144]** *Purificación del anticuerpo.* Los anticuerpos recombinantes expresados de las células transfectadas estables se purificaron por cromatografía de afinidad de la proteína A. Los sobrenadantes celulares se diluyeron con 10X de tampón de proteína A (Tris 0,2 M, NaCl 1,4, 10 nM de EDTA, pH 8,5) en 1X, y se purificaron en 1 mL de columna de proteína A. Los anticuerpos extraídos se dializaron en TFS, pH 7,2, antes de su análisis adicional.
- 45
- 50 **[0145]** *Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).* Las células diana para los ensayos que involucran Ab1 y Ab3 se prepararon en Centocor transfectando células de mieloma de ratón Sp2 / 0 con una forma de transmembrana de Ag1 y Ag3, respectivamente. Tanto las células que expresan Ag1 como las de Ag3 se cultivaron en IMDM que contiene SFB inactivado por calor, 2 nM de L - glutamina, 1 nM de piruvato de sodio, 0,1 de aminoácidos no esenciales. Las células adherentes que expresan Ag2 se obtuvieron de CACT y se cultivaron en medio DMEM que contiene 10 % de SFB, 2 mM de L - glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales. Todas las células se subcultivaron dos veces a la semana y se mantuvieron en fase log de crecimiento. El medio de cultivo y los suplementos se adquirieron en Gibco (Invitrogen).
- 55
- 60 **[0146]** En el día del ensayo, las células diana de mieloma que expresan Ag se centrifugaron y se lavaron una vez con TFS. Las células diana que expresan Ag2 adherentes se eliminaron con tripsina y se lavaron dos veces. Las células se ajustaron a 1 x 10<sup>6</sup> células / ml con medio de cultivo y 15 µl de BATDA del reactivo de marcaje fluorescente ((bisacetoximetil) - 2,2':6'2'' - terpiridina - 6, 6'' - dicarboxilato) (en el Kit de Citotoxicidad Delfia EuTDA, Perkin - Elmer Life Sciences; Blomber, K *et al*) que se añadió a 5 ml de células. Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con agitación ocasional; se lavaron dos veces con el medio. Inmediatamente antes de mezclarse con las células efectoras, las células diana se centrifugaron y se volvieron a suspender en 2 x 10<sup>5</sup> células / ml en medio de cultivo.
- 65 **[0147]** Las células efectoras de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron a partir de sangre heparinizada de donantes sanos. Las muestras de sangre se diluyeron con tampón fosfato salino (TFS) y las CMSPs se aislaron por la centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll - Hypaque (Amersham). Tras la centrifugación, las CMSPs se recogieron, se lavaron dos veces, y se mantuvieron durante la noche en el medio de

cultivo a 37 °C con el 5 % de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las CMSPs se recogieron, se lavaron y se volvieron a suspender en el medio en  $1 \times 10^7$  células / ml.

5 [0148] Para los ensayos de citotoxicidad, las diluciones del anticuerpo en 100 µl de medio de cultivo se añadieron a una placa de 96 pocillos con fondo redondo. Cincuenta µl de células efectoras y 50 µl de células diana marcadas con BADTA se añadieron a las diluciones de Ab y un efector para la proporción celular de la diana de 50:1. La placa se centrifugó brevemente para proporcionar efectores y dianas en contacto entre sí, y se incubó durante 2 horas a 37 °C en 5 % de atmósfera de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se transfirieron 20 µl de sobrenadante a una placa de 96 pocillos con fondo plano y se añadieron 200 µl de solución mejorada de Europio (del Kit de Citotoxicidad Delfia).  
10 Tras agitar la placa durante 10 minutos, la fluorescencia se midió en un fluorómetro a tiempo resuelto (EnVision Instrument, Perkin-Elmer). El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó como (liberación experimental – liberación espontánea) / liberación máxima – liberación espontánea) X 100. La liberación espontánea se determinó incubando las dianas con el medio en lugar de las células efectoras, y la liberación máxima se determinó incubando las dianas con 10 ul de solución de lisis que contiene digitonina (en el Kit de Citotoxicidad Delfia EuTDA).

15

### Resultados y discusión

20 [0149] Se construyó el vector de expresión p3629 (Figura 13), permitiendo la expresión del dominio catalítico de la sialidasa A *Arthrobacter ureafaciens* en las células de mamíferos. La secuencia de codificación para la secuencia líder de la hormona del crecimiento humano se unió operativamente al dominio catalítico de la enzima para forzar la secreción extracelular de la sialidasa A. Las células HEK293 se transfectaron de manera transitoria con el plásmido de expresión, y el sobrenadante se recogió para la actividad de la sialidasa en el anticuerpo anti –FNT α purificado. El anticuerpo se incubó durante la noche con medio condicionado a partir de las células transfectadas de p3629, o las células transfectadas del plásmido de control. El análisis por HPLC de los oligosacáridos liberados del anticuerpo tras la incubación con el sobrenadante condicionado fue indetectable en todos excepto los glicanos liberados de la línea celular parental transfectada del control. Por lo tanto, la actividad de la sialidasa solo estaba presente en el sobrenadante celular transfectado de p3629, y no en el sobrenadante transfectado del control.

25

30

### EJEMPLO 8: CO – EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO Y LA SIALIDASA

35 [0150] El objetivo de estos estudios era generar una línea celular huésped capaz de secretar una enzima sialidasa en el medio de cultivo, que podría transfectarse además con un anticuerpo que codifica una secuencia produciendo de este modo anticuerpos glicosilados que serían desialilados. La línea celular de mieloma de ratón, C168M, que expresa un anticuerpo se transfectó con el vector preparado en el Ejemplo 7, p3629, y los clones estables seleccionados y cribados para la actividad de la sialidasa en el sobrenadante. Tal y como se muestra a continuación en la Tabla 2, de los 17 clones analizados fluorométricamente (MFU) en este experimento, seis eran positivos para la actividad de la sialidasa y la expresión de la sialidasa continuó durante 6 semanas, lo que indica clones estables.

35

40

Tabla 2

Nº de clon	Actividad de la sialidasa – clones primarios (MFU)	Actividad de la sialidasa de 6 semanas (MFU)
TS		0
45 1	0	
2	0	
3	332	7536
4	0	
50 5	924	11544
6	0	
7	0	
8	0	
9	0	
10	-0	
55 11	0	
12	6307	23140
13	57	519
14	26	
15	305	6408
60 16	0	
17	942	1765

65

[0151] El análisis adicional de los anticuerpos purificados de los clones positivos de sialidasa A por SDS – PAGE indicó que aún expresaban anticuerpos intactos, y la expresión de la sialidasa no afecta a los niveles de expresión. El análisis de carbohidrato de los anticuerpos indicó que todos los clones contenían menos del 2 % de ácido siálico,

en comparación con el anticuerpo de la célula huésped transfectada sin sialidasa, que poseía casi el 15 % de ácido siálico (Tabla 3).

Tabla 3

	Contenido de ácido siálico (%)	Contenido de fucosa (%)	ADCC EC40 (ng / mL)	ADCC lisis máx (%)
Control transfectado	14,8	90	39,1	37,3
Clon 3	1,6	94	5,7	64,3
Clon 5	0,76	85	24,9	47,0
Clon 12	1,3	92	45,2	41,9
Clon 13	2,77	65	22,3	49,0
Clon 15	1,36	80	55,2	41,8
Clon 17	1,6	73	8,9	43,9

[0152] Se analizaron los anticuerpos con bajo ácido siálico de los clones que sobreexpresan la sialidasa para mejorar la actividad ADCC en comparación con C168M de TS (Figura 14). Como muestra la Tabla 3, algunas de las muestras mostraron un EC40 más bajo y lisis máxima más elevada después del anticuerpo anti – FNT  $\alpha$  de tipo salvaje, lo que indica que el contenido de ácido siálico más bajo tiene un efecto en las propiedades biológicas de este anticuerpo.

[0153] Se ha diseñado un plásmido de expresión para secretar el dominio catalítico de la enzima de la sialidasa A *Arthrobacter ureafaciens* en el medio de cultivo de las células de mamíferos. Esta enzima secretada es activa en los sobrenadantes celulares, y es capaz de eliminar el residuo de ácido siálico de los oligosacáridos N – ligados presentes en la región Fc de los anticuerpos. La transfección estable de las líneas celulares que expresan anticuerpos con este constructo de expresión da lugar a clones que secretan actividad de la sialidasa A en el sobrenadante del cultivo, junto con el anticuerpo. Los anticuerpos recuperados de estos cultivos celulares contenían menos ácido siálico que se traduce en las mejoras funcionales en la actividad ADCC. Estos resultados sugieren que el método puede utilizarse para generar células huésped que expresan glicoproteínas recombinantes y se utiliza para crear cultivos para los glicoconjugados mínimamente sialilados.

#### EJEMPLO 9: EXPRESIÓN DE CHO DE LA SIALIDASA

[0154] Las células CHO son importantes células huésped para la fabricación de biofarmacéuticos. El plásmido p3629 (Figura 13) se utilizó para transfectar de manera estable una línea celular CHO capaz de transfectarse además con un vector para la expresión de una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo.

[0155] Las células CHO (C1835A) se transfectaron con 30 ug de p3629 que se había linearizado mediante la digestión de restricción con Bgl II utilizando FuGene 6 (Roche, Inc.). Las células transfectadas se mantuvieron en el medio de cultivo con 700 ug / mL de antibiótico de Geneticina (Invitrogen, Inc.) para seleccionar los transfectantes estables. Los clones resistentes a los antibióticos se agruparon, se expandieron, y se analizaron para la actividad de la sialidasa.

[0156] La actividad de la sialidasa se analizó en los sobrenadantes celulares de los cultivos celulares viables utilizando un fluoróforo. A 200 uL de sobrenadante celular se añadieron 150 uM 2' - (4 - metilumbeliferil) – alfa – D – N – ácido acetilneuramínico en 100 mM de tampón citrato – fosfato, pH 6,5 a 37 °C, seguido por la adición de 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M para detener la reacción. La excitación se realizó a 366 nm y la emisión a 446 nm. Las unidades fluorométricas (UF) se normalizaron dividiendo la lectura fluorométrica individual para cada línea celular por el número total de células viables. La actividad de la sialidasa en el medio de cultivo, tal y como se mide en UF, se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Dilución	Semana 3		Semana 8	
	Control	Transfectada	Control	Transfectada
1	1880	4004	2547	7924
0,5	1742	2983	2276	4733
0,25	1566	2320	1967	2915
0,125	1558	2046	1960	2569
0,0625	1489	1990	1862	2139
0,03125	1513	1987	2036	2444

[0157] Como la actividad de la sialidasa a las 3 y 8 semanas de la post selección se mantiene constante o aumenta con el tiempo, se confirmó la expresión estable y la secreción de la enzima de sialidasa en el sobrenadante del cultivo.

**[0158]** Resultará evidente que la invención puede ponerse en práctica de otro modo diferentes al particularmente descrito en la descripción y ejemplos precedentes.

LISTADO SECUENCIAL

5

**[0159]**

<110> CENTOCOR, INC.

10

<120> MÉTODOS Y VECTORES PARA GENERAR  
INMUNOGLOBULINAS ASIALILADAS

<130> CEN5159PCT

15

<140> Para asignarse  
<141> 2007 – 12 - 26

<150> 60 / 882301  
<151> 2006 – 12 – 28

20

<160> 2

<170> FastSEC para Versión de Windows 4.0

25

<210> 1  
<211> 520  
<212> PRT  
<213> Arthrobacter ureafaciens

30

<400> 1

35

40

45

50

55

60

65

5	Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu
	1				5					10					15	
	Cys	Leu	Pro	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Thr	Pro	Pro	Asn	Ser
				20					25					30		
	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Ala	Ala	Asp
			35					40					45			
10	Arg	Thr	Ala	Ala	Asn	Phe	Phe	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Leu	Thr	Tyr	Leu
	50					55						60				
	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Ala	Trp	Asp	Gly	Arg	Pro	Gly	Ser	Ala
	65				70						75					80
15	Ala	Asp	Ala	Pro	Asn	Pro	Asn	Ser	Ile	Val	Gln	Arg	Arg	Ser	Thr	Asp
					85					90					95	
	Gly	Gly	Lys	Thr	Trp	Gly	Pro	Val	Gln	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	His	Val
				100					105					110		
20	Ala	Asp	Ala	Ser	Gly	Pro	Arg	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ser	Tyr	Ile
			115					120					125			
	Tyr	Asp	Ala	Glu	Ala	Asn	Lys	Val	Phe	Ala	Phe	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys
	130					135						140				
25	Asp	Gln	Gly	Phe	Gly	Gly	Ser	Gln	Phe	Gly	Asn	Asp	Asp	Ala	Asp	Arg
	145				150						155					160
	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Glu	Ser	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Thr
				165						170					175	
30	Trp	Ser	Gln	Pro	Arg	Leu	Ile	Thr	Ser	Val	Thr	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser
			180						185					190		
	Lys	Thr	Asn	Pro	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Ser	Asn	Phe	Ala	Ser	Ser
			195					200					205			
35	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	Leu	Lys	Tyr	Gly	Pro	His	Lys	Gly	Arg	Leu	Ile
	210						215					220				
	Gln	Gln	Tyr	Ala	Gly	Asp	Val	Arg	Gln	Ala	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Ile
	225				230						235					240
40	Gln	Ala	Tyr	Ser	Val	Tyr	Ser	Asp	Asp	His	Gly	Val	Thr	Trp	His	Lys
				245						250					255	
	Gly	Ala	Asn	Val	Gly	Asp	Arg	Met	Asp	Glu	Asn	Lys	Thr	Val	Glu	Leu

45

50

55

60

65

				260					265				270			
5	Ser	Asp	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Asn	Arg	Gly
			275					280					285			
	Tyr	Arg	Lys	Val	Ala	Val	Ser	Thr	Asp	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Gly	Pro
		290					295					300				
10	Val	Ser	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Asn	Gly	Ala	Ile
	305					310					315					320
	Ala	Arg	Met	Phe	Pro	Asn	Ala	Ala	Gln	Gly	Ser	Ala	Asp	Ala	Lys	Lys
					325					330					335	
15	Leu	Ile	Phe	Thr	Asn	Ala	Asn	Ser	Lys	Thr	Gly	Arg	Glu	Asn	Val	Ser
				340					345					350		
	Ala	Arg	Val	Ser	Cys	Asp	Asp	Gly	Glu	Thr	Trp	Pro	Gly	Val	Arg	Thr
			355					360					365			
20	Ile	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Ala	Tyr	Ser	Thr	Val	Thr	Arg	Leu	Ala	Asp
		370					375					380				
	Gly	Lys	Phe	Gly	Val	Leu	Tyr	Glu	Gly	Asn	Tyr	Thr	Asp	Asn	Met	Pro
	385					390					395					400
	Phe	Ala	Thr	Phe	Asp	Asp	Ala	Trp	Leu	Asn	Tyr	Val	Cys	Ala	Pro	Leu
				405						410					415	
25	Ala	Val	Pro	Ala	Val	Asn	Ile	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Gln	Glu	Val	Pro
				420					425					430		
	Val	Thr	Val	Thr	Asn	Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala
			435					440					445			
30	Thr	Val	Tyr	Thr	Pro	Ser	Gly	Trp	Ser	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Val	Pro
		450					455					460				
	Asp	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Val	Ala	Leu	Thr	Ala
	465					470					475					480
35	Pro	Ala	Asp	Ala	Ser	Gly	Pro	Arg	Ser	Leu	Asn	Ala	Ala	Phe	Thr	Thr
				485						490					495	
	Ala	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Gln	Phe	Thr	Phe	Thr	Ala	Thr	Thr	Pro	Val
			500						505					510		
40	Ala	Pro	Gln	Val	Gly	Leu	Thr	Ile								
			515					520								

45 <210> 2  
 <211> 1563  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica el domino catalítico de la sialidasa *Arthrobacter ureafaciens*.  
 <400> 2

55

60

65

5 atggctacag gctcccggac gtccectgctc ctggettttg gcctgctctg cctgcccctgg 60  
 cttcaagagg gatccgcccc cactccgccc aattcgccca cgcttccacc gggcagcttc 120  
 tctgaaacca atctggcggc cgaccgcacg gcggcgaatt tcttctaccg gattcccgcg 180  
 cttacctacc ttggcaacga cgtggtcctt gcagcgtggg acggtcgccc gggttcggcg 240  
 gcggaacgccc cgaacccgaa ctcgatcgtc cagcgcggaa gcacggacgg tggcaagacc 300  
 10 tggggggccgg tccaagtgat cgccgcaggc cacgtcgccg atgccagcgg cctcagatac 360  
 ggctacagcg atccctcgta catctacgac gcggaagcca acaaggcttt cgctttcttc 420  
 gtgtactcga aggaccaagg ctttggcggc agtcagttcg gcaacgacga cgcggaccgg 480  
 aacgtcattt cctccgcccgt catcgagtct tccgacgccg gcgtgacatg gagccagccc 540  
 cgctcatca cctccgtcac caagccgggt accagcaaga ccaaccggc agccggcgac 600  
 15 gtccgctcca actttgctc ctccggtgag ggcattccagc tcaaatacgg cccgcacaag 660  
 ggccgtctca tccagcagta cgccggcgac gtgcccgaag ctgacggaag caacaagatc 720  
 caggcctaca gcgtctattc agacgatcac ggcgtcacgt ggcacaaggg tgccaacgtg 780  
 ggcgaccgga tggacgagaa caagactgtg gaactgtccg acggtcgggt cctgctcaac 840  
 20 tcccgggaca acgccaaccg gggctaccgc aaggtggccg tctccacgga cggcggagcc 900

acgtacggcc ccgtcagcca ggacacggaa ttgcccggacc ctgccaaaca cggtgcaatc 960  
 gcccgcgatgt tccccaacgc ggcgcagggc tccgcagacg cgaagaaact gatcttcacc 1020  
 25 aacgcaaact ccaagaccgg ccgcgaaaac gtctcggccc gggctctctg tgacgacggc 1080  
 gaaacctggc cgggcgtccg caccatccgt tccggcttct cggcctactc aacagtgacc 1140  
 cgcctggcgg acggaaagtt cggcgtcctc tacgagggca actacacgga caacatgcc 1200  
 ttcgccacct tcgacgacgc gtggttgaac tacgtctgcg ctcccttggc agtaccggca 1260  
 gtcaacatcg ccccgagcgc aacgcaggag gttccggtga ccgtcactaa ccaggaagca 1320  
 30 accacgcttt ccggcgcgac cgcaactgtc tatacgcctg cggggtggtc tgccaccacg 1380  
 gtgcccgtgc ccgacgtcgc cccggcgcg tccgtcaccg tgaccgttgc actgaccgca 1440  
 ccggcggacg ccagtggccc gcgcagcctc aacgcggcat tcacgacggc ggatggccgg 1500  
 gtttcgcagt tcaccttcac cgccaccacg cccgtggctc cgcaagtggg ccttaccatc 1560  
 35 tag 1563

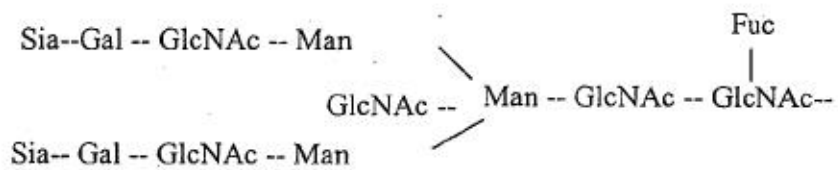
40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65



## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para proporcionar un actividad enzimática de la sialidasa en un cultivo que comprende células de mamífero modificadas para expresar una molécula que contiene Fc, por el que los glicanos de la molécula que contiene Fc pueden actuar por la actividad enzimática de la sialidasa del polipéptido, comprendiendo la transfección de la célula modificada de mamífero con un vector que codifica el dominio catalítico de la enzima A de la sialidasa *Arthrobacter ureafaciens*, en el que el polipéptido se secreta en el cultivo junto a la molécula que contiene Fc.
- 10 **2.** Un método para controlar las propiedades de una molécula que contiene Fc expresada en una línea celular, comprendiendo la reducción de la sialilación de los oligosacáridos en la región Fc mediante la transfección de la línea celular con un vector que codifica el dominio catalítico de la enzima A de la sialidasa *Arthrobacter ureafaciens*, en el que la molécula que contiene Fc expresada comprende una cantidad reducida de residuos de ácido siálico, en el que las propiedades de la molécula que contiene Fc controlada tienen la avidéz de la molécula para para multiplicar proteínas diana localizadas; la afinidad de uno o más receptores gamma Fc de FcγRI, FcγRII, y FcγRIIIA; la actividad ADCC; la activación de macrófagos o monocitos; y semivida del suero.
- 15 **3.** El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la molécula que contiene Fc es un anticuerpo y la línea celular de mamífero se selecciona del grupo formado por COS - 1, COS - 7, HEK293, BHK21, CHO, BSC - 1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, HeLa, YB2 / 0 o Y3, células de mieloma o linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.
- 20 **4.** El método de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti - FNT α y la línea celular es C168M.
- 25 **5.** El método de la reivindicación 2, en el que la molécula que contiene Fc tiene un dominio de unión específico para una diana, dicha diana:
- 30 (i) es una diana inmovilizada; o  
(ii) se expresa en la superficie de una célula
- 6.** Un vector de expresión que comprende una secuencia nucleótida que codifica la enzima A de la sialidasa *Arthrobacter ureafaciens*, en el que el vector es capaz de expresar un polipéptido que tiene una actividad enzimática de la sialidasa en un cultivo de células de mamíferos que expresa una molécula que contiene Fc.
- 35 **7.** El vector de la reivindicación 6, en el que la línea celular de mamífero se selecciona del grupo formado por COS - 1, COS - 7, HEK293, BHK21, CHO, BSC - 1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, HeLa, YB2 / 0 o Y3, células de mieloma o linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.
- 40 **8.** El vector de la reivindicación 6, en el que el vector comprende:
- (i) una secuencia de señal, por ejemplo una secuencia de señal de la hormona del crecimiento humano;  
(ii) una secuencia promotora, por ejemplo una secuencia promotora CMV; y  
(iii) una resistencia antibiótica, por ejemplo neomicina.
- 45 **9.** Un método para producir una molécula que contiene Fc que comprende el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5.
- 50 **10.** El método de la reivindicación 9, en el que la molécula que contiene Fc es un anticuerpo.

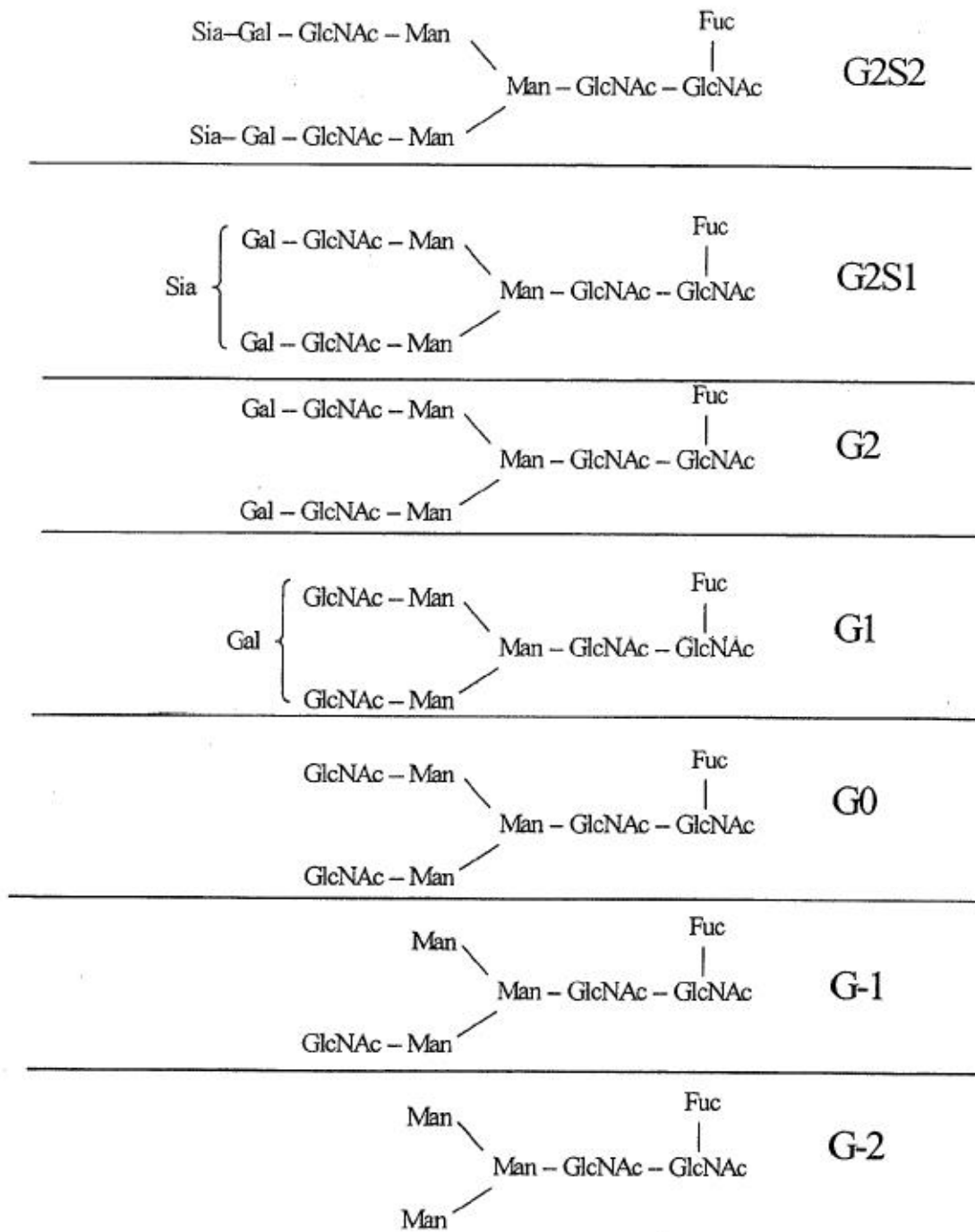
*Figura 1*



Fuc = fucosil; Gal = galactosil; Glc = glucosil; GlcNAc = N - acetilglucosaminil; Man = manosil; y Sia = sialil (NANA, N - acetilneuraminil).

\*Sia, ácido siálico, que es normalmente NANA, 5 - N - ácido acetilneuramínico, (NeuAc) o NGNA, 5 - N - ácido glicolilneuramínico (NeuGc). Se han descubierto otros ácidos siálicos o pueden sintetizarse químicamente.

*Figura 2*



Misma leyenda que la Figura 1

*Figura 3*

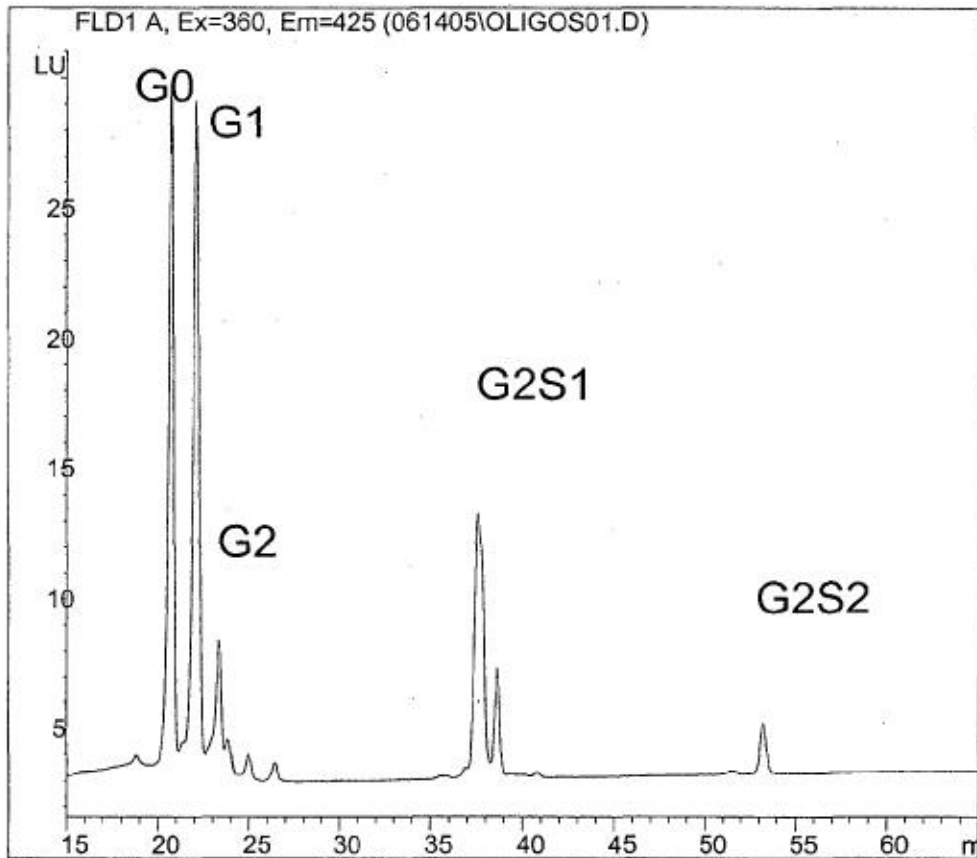
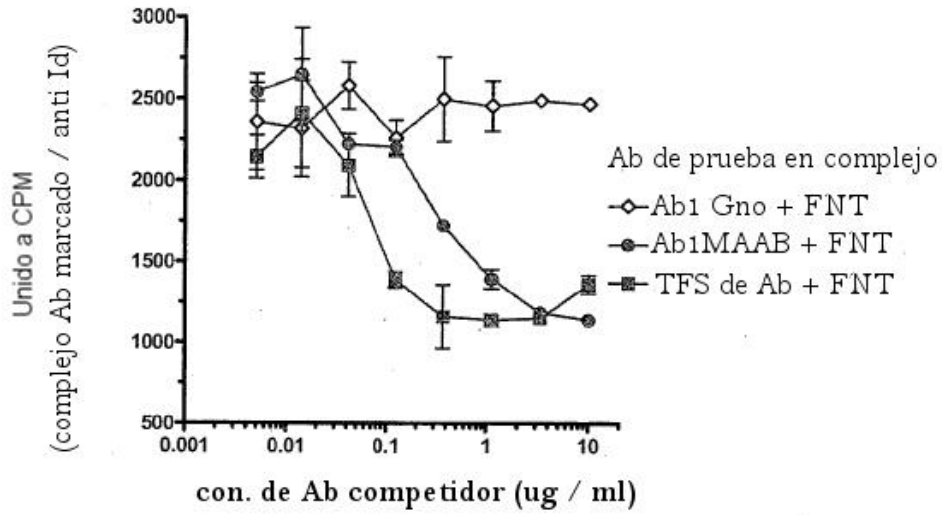


Figura 4

A)



B)

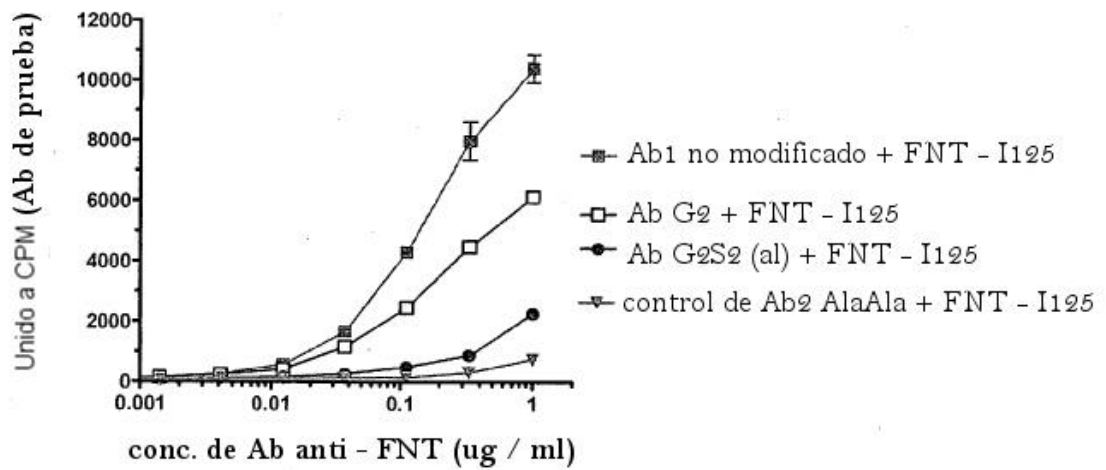


Figura 5

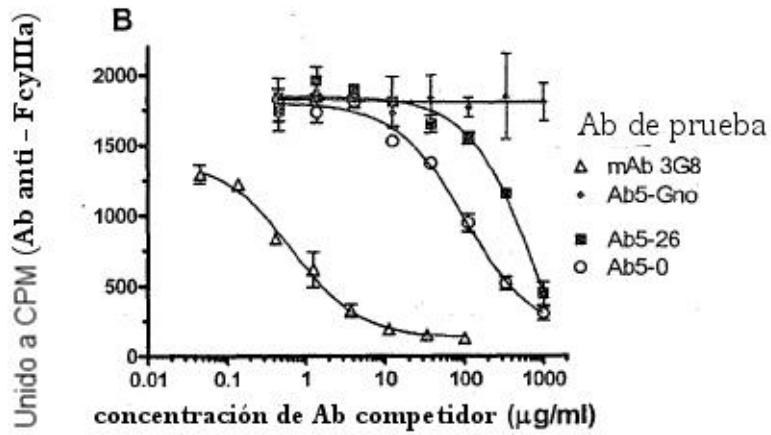
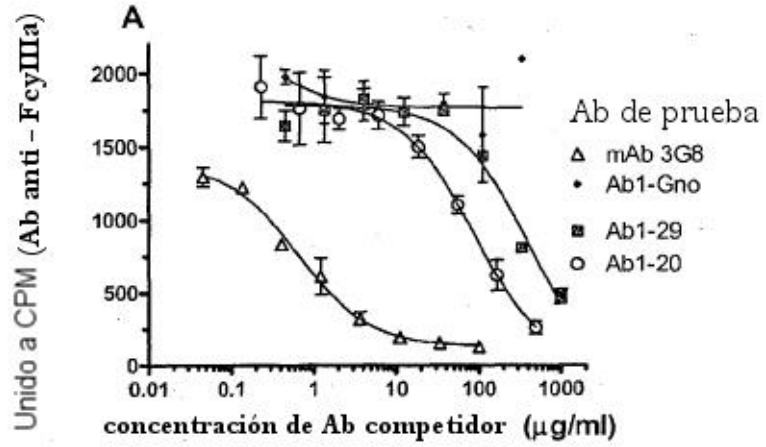


Figura 5 (continuación)

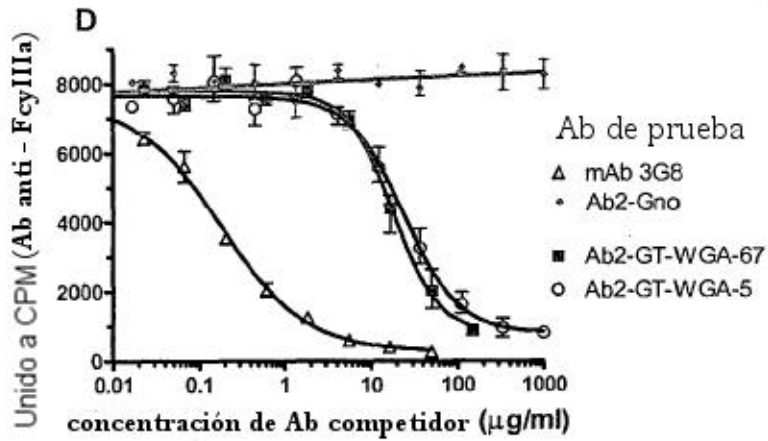
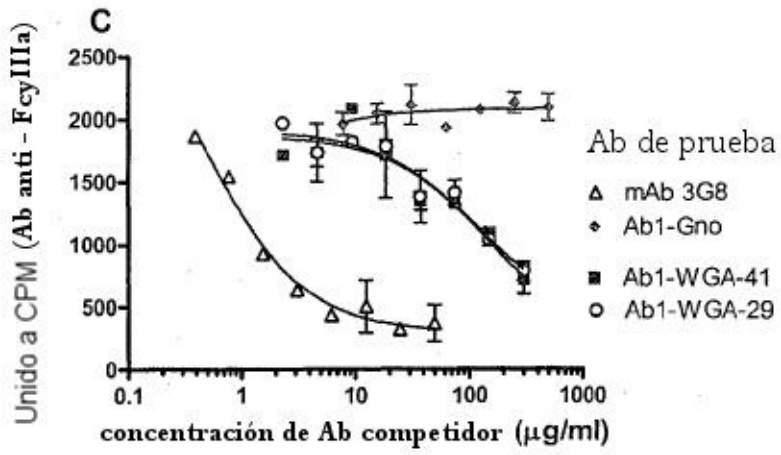


Figura 6

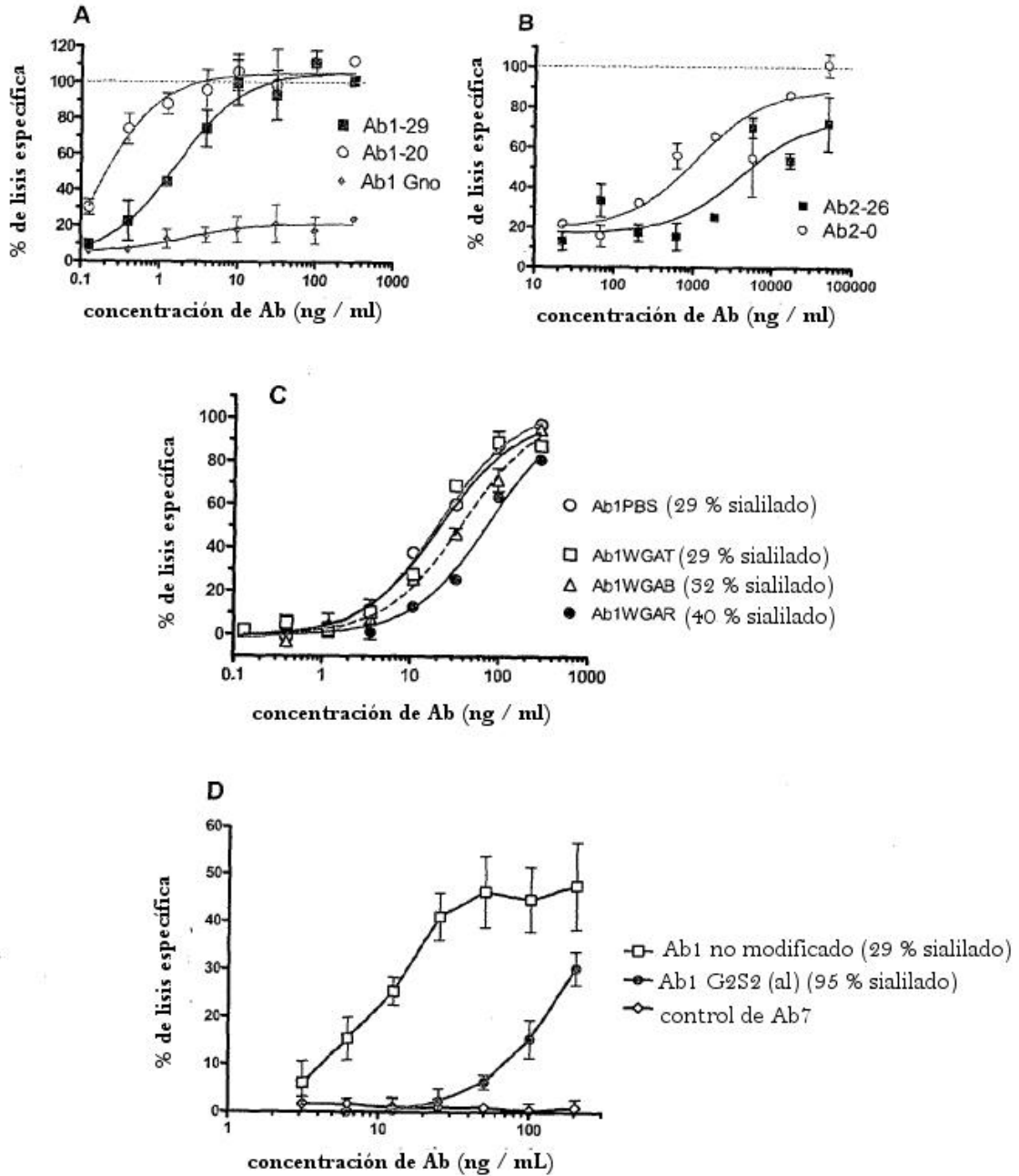
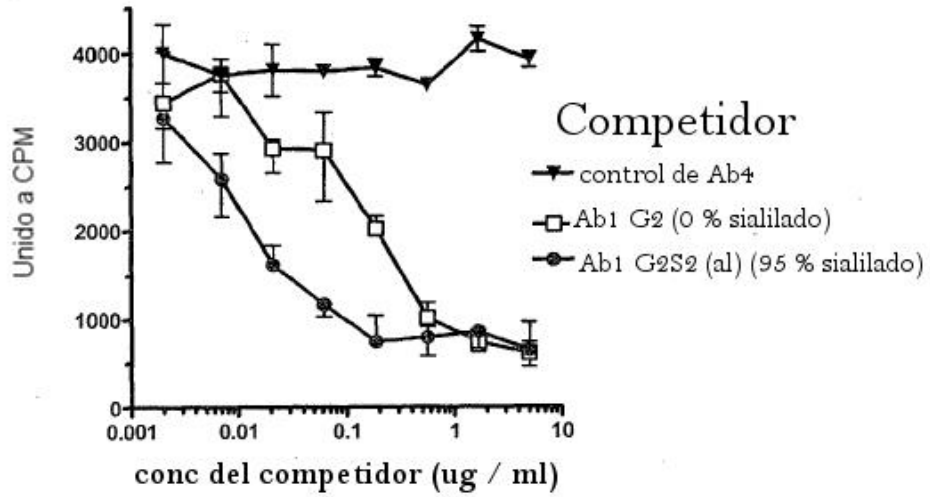




Figura 7

A)



B)

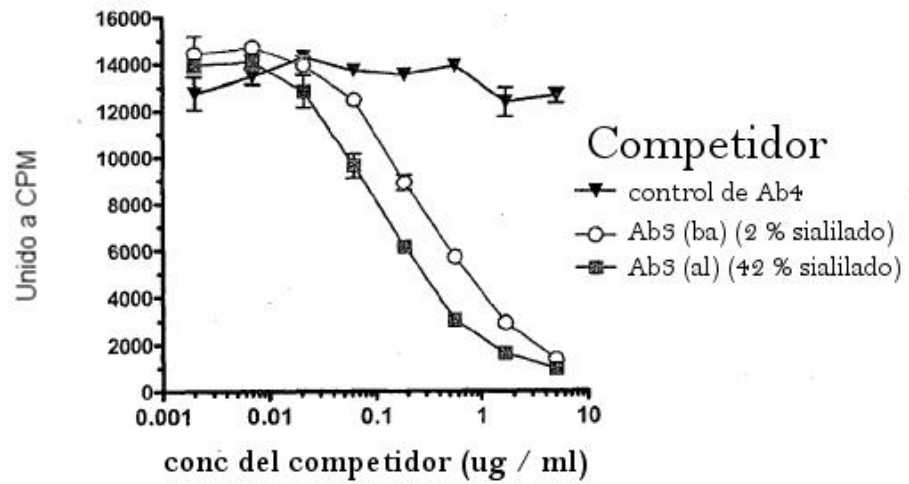


Figura 8

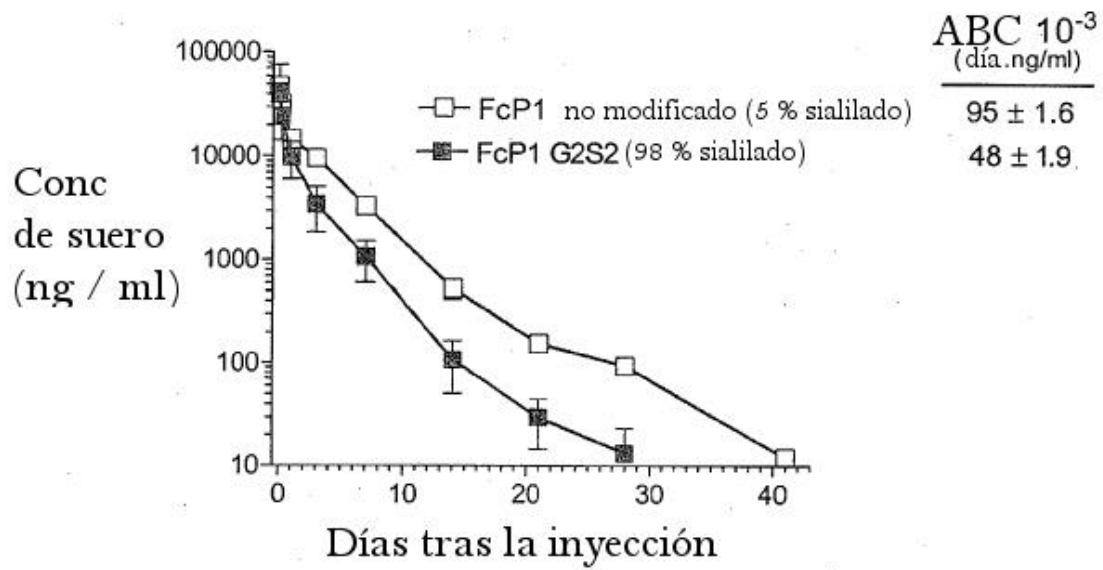


Figura 9

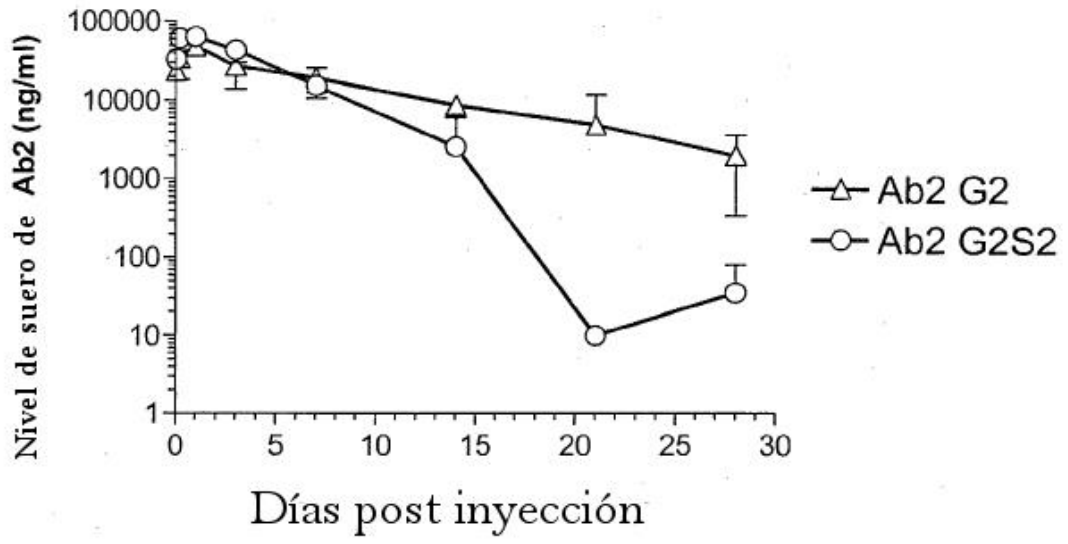


Figura 10

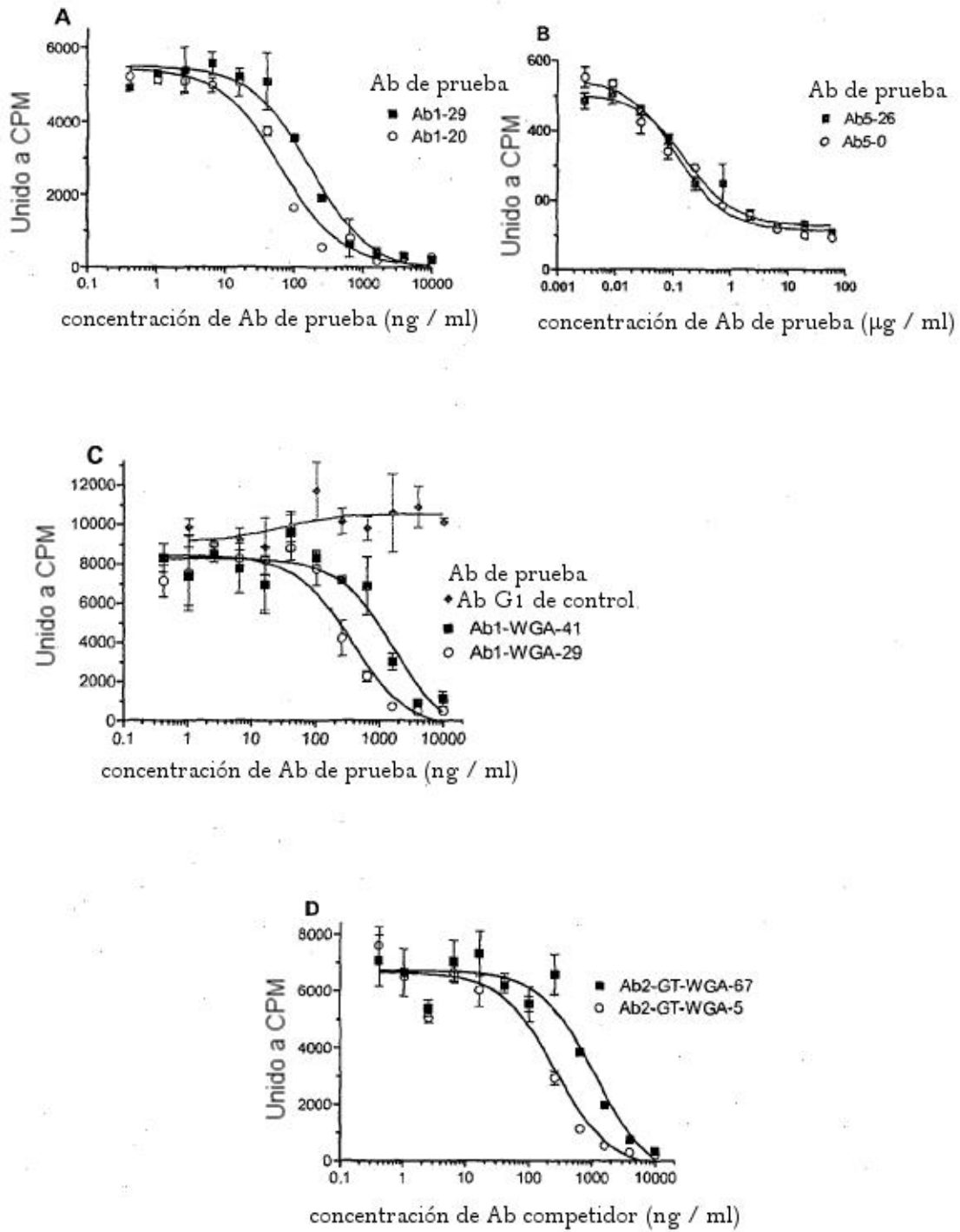


Figura 11

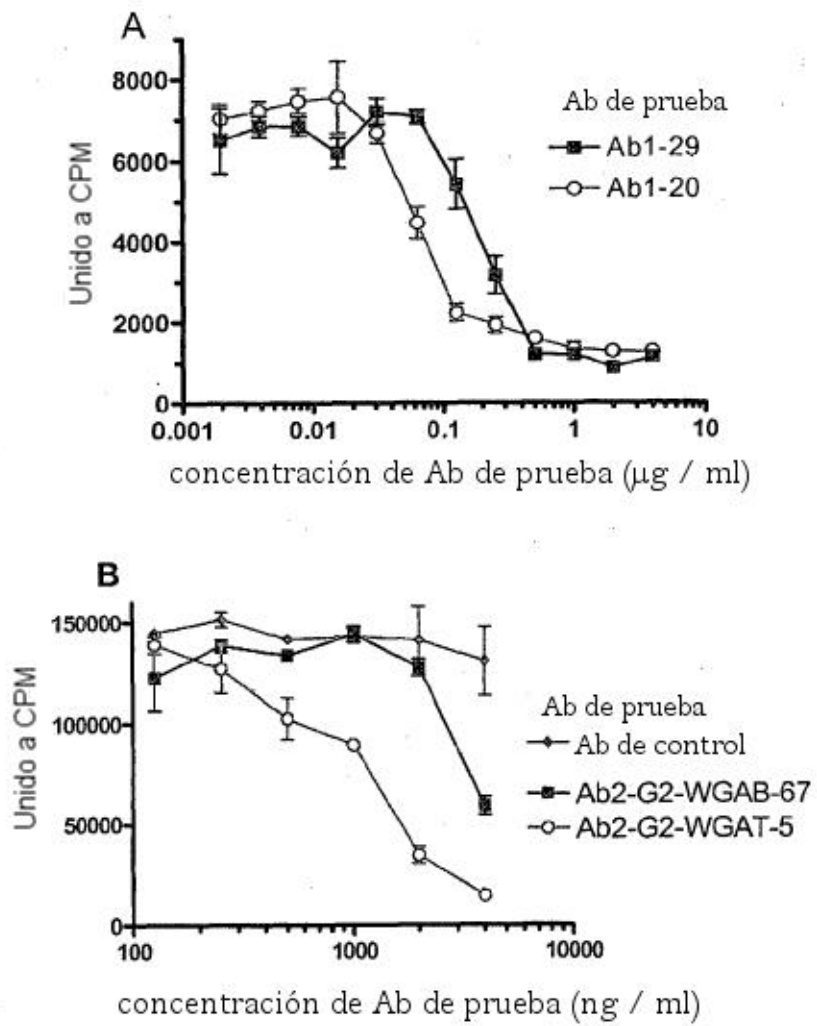


Figura 12

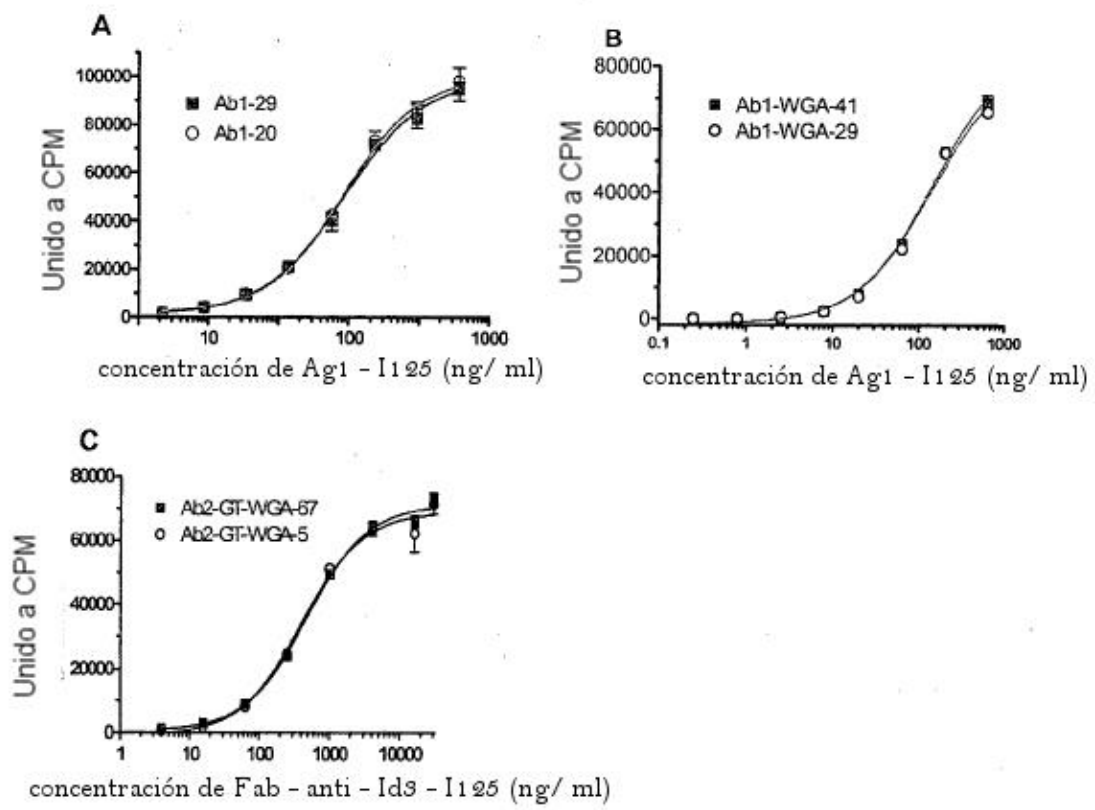


Figura 13

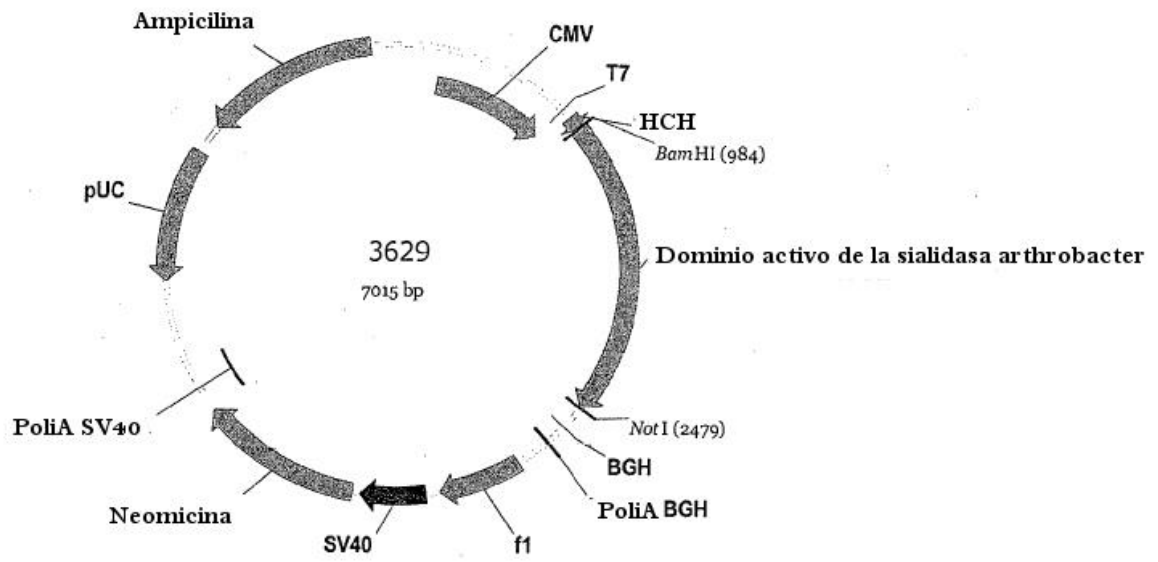


Figura 14

Resumen de las células K2 del donante 1

